

AS: 99.636

E.Mail:bricas@brigardycastro.com.co

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 05108673 00000003 Folios: 199
Fecha (IMP): 2006-01-25 16:29:55
Trámite : 002 PATENTES 0 1 REGISTRO/ 444 RESPUESTA
Dependencia: 2829 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REF: Expediente No. 05 108.673 - Solicitud de Patente
a favor de THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY
Titulada: ANTÍGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE
INFESTACIONES DE GARRAPATAS DE MÚLTIPLES ESPECIES

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, vecino de Bogotá, portador de la tarjeta profesional No. 57492, obrando como apoderado de la sociedad THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY, según lo acredita el documento de poder anexo, para dar cumplimiento al requerimiento notificado por fijación en lista el 01 de Diciembre de 2005, de acuerdo con los Artículos 38 y 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, me permito allegar:

1. Fotocopia autenticada del documento de poder conferido por THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY, incluyendo el Certificado que acredita la Existencia y Representación Legal, debidamente apostillado, junto con su correspondiente traducción.
2. Documento donde consta la cesión del derecho a la Patente otorgado por los inventores al solicitante, debidamente apostillado, junto con su correspondiente traducción.
3. Copia certificada por la Oficina de Patentes de Estados Unidos de la primera solicitud presentada para la misma invención, de la cual REIVINDICAMOS PRIORIDAD, junto con su correspondiente traducción al castellano.
4. Extracto para publicación y Tarjeta de archivo Temático.

De la señora Jefe atentamente,


JUAN PABLO CADENA SARMIENTO
C.C. No. 80.410.337 de Usaquén
Cra 7 No. 16-58 Piso 9

Bogotá, Enero 24, 2006
CHP/MEV/hsr.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO		1		
PATENTE DE INVENCION <u>X</u> PCT <u> </u> MODELO DE UTILIDAD <u> </u> DISEÑO INDUSTRIAL <u> </u>						
(21) N° de solicitud: 05 108.673		(22) Fecha de solicitud: 25-10-2005		FIGURA CARACTERISTICA 6 x 6 cm		
(541) Clasificación Internacional:						
(71) Solicitante(s) THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY						
(72) Inventor(es) José de Jesús de la Fuente, Catherine M. Kocan, Consuelo García-Almazan, Edmour F. Blouin						
(74) Agente: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO						
(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
		10/872,789		25-10-2004		US
(85) Fecha inicio fase nacional:			(87) Publicación internacional:			
(86) Datos relativos a la presentación de la solc. PCT			Fecha:			
Fecha de presentación de la solicitud:			No. Publicación: WO			
No. de solicitud PCT/						
(54) Título: ANTÍGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE GARRAPATAS DE MÚLTIPLES ESPECIES						
Resumen:						
Antígenos protectores de amplio rango contra infestaciones de garrapata, secuencias de gen y proteínas codificadas para dichos antígenos, vacunas relacionadas y métodos útiles para inducir una respuesta inmune.						
CONTINUA AL RESPALDO ...						

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION	7
---	---	---

(21) N° de solicitud: 05 108.673			(51) Int Ct:		
22) Fecha de solicitud: 25-10-2005			(71) Solicitante(s) THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY		
30 Prioridad	31 No. Prioridad	32 Fecha	33 País		
	10/972,789	25-10-2004	US		
			(72) Inventor(es) José de Jesús de la Fuente, Katherine M. Kocan, Consuelo García-Alamazán, Edmour F. Blouin		
			(74) Agente: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO		
(54) Título: ANTÍGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE GARRAPATAS DE MÚLTIPLES ESPECIES					

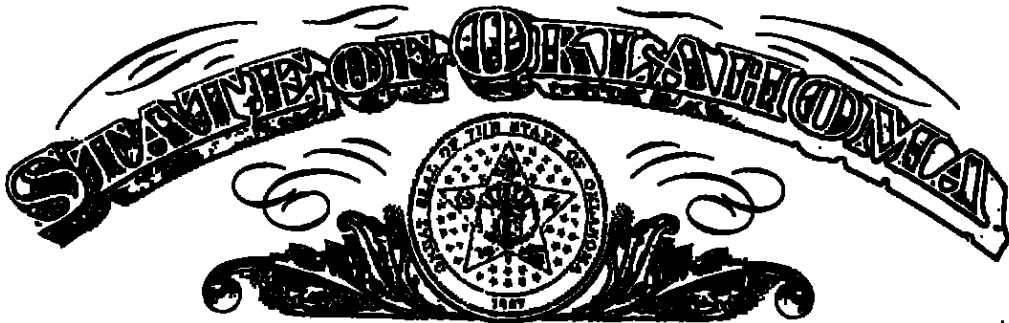
Resumen

Antígenos protectores de amplio rango contra infestaciones de garrapata, secuencias de gen y proteínas codificadas para dichos antígenos, vacunas relacionadas y métodos útiles para inducir una respuesta inmune.

96

As 99636

OFFICE OF THE SECRETARY OF STATE



APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: *United States of America*

This public document

2. Has been signed by *Cindy L. Malayer*

3. Acting in the capacity of *Notary Public, State of Oklahoma*

4. Bears the seal/stamp of *Cindy L. Malayer, Notary Public*

CERTIFIED

5. At *Oklahoma City, Oklahoma, U.S.A.*

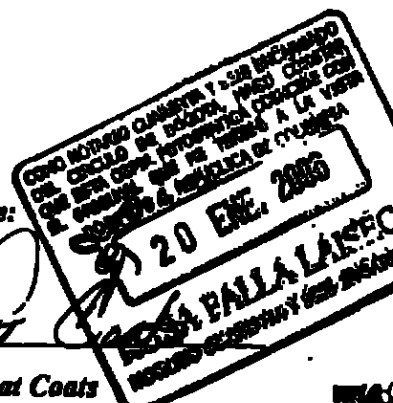
6. The *20th* day of *December, 2005*

7. By *Administrative Technician*

8. Notary Public
Secretary of the State of Oklahoma



10. Signature:



Pat Coats
Administrative Technician

Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistirse a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-58 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre

Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We). The Board of Regents for
Oklahoma State University

domiciled in 203 Whitehurst
Stillwater, OK 74078
United States of America

Hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainment of vegetable varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciled in Carrera 7 No. 16-58, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in Stillwater, OK (U.S.A.)

this 6th day of December

Signature

Name

Title



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy de de
personalmente compareció ante mí

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él (ella) es

de

Sociedad legalmente constituida para un periodo de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder, que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del objeto social de la sociedad.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las pruebas de la existencia de la sociedad

Estado de
con fecha

y que quien confiere el presente poder es su representante.

Notario Público (sello)

**CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL**

Hoy de de , compareció(eron) ante mí

a quien (es) conozco y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es) declara(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

Notario Público (sello)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 6th day of December of 2005 personally appeared before me

Stephen W.S. McKeever

to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the

Vice President for Research and Technology Transfer of

The Board of Regents for Oklahoma State University

Which is legally constituted for a term not yet expired, that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney: that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purpose of company.

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

State of Oklahoma (U.S.A.)
under date of December 6, 2005

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative.

Cindy L. Malayer
Public Notary (Seal)

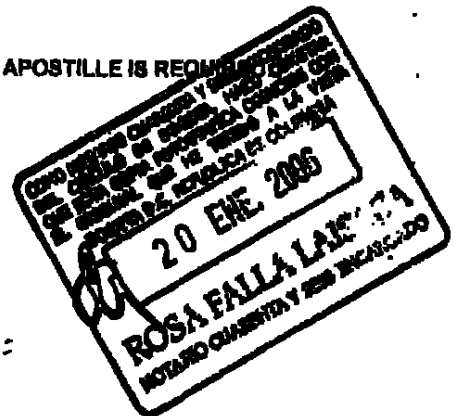
Cindy L. Malayer
Commission Number 00018223
Commission Exp. 12/9/2008
NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON

On this day of of
personally appeared before me

who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s) the document for the uses and purposes therein expressed

Notary Public (Seal)

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED



98

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por The Board of Regents for Oklahoma State University domiciliada En 203 Whitehurst, Stillwater, Oklahoma, Estados Unidos de América.

**OFICINA DEL SECRETARIO DE ESTADO
ESTADO DE OKLAHOMA**

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por Cindy L. Malayer
3. actuando en capacidad de notario público, Estado de Oklahoma
4. lleva el sello/timbre de Cindy L. Malayer, notario público

Certificado

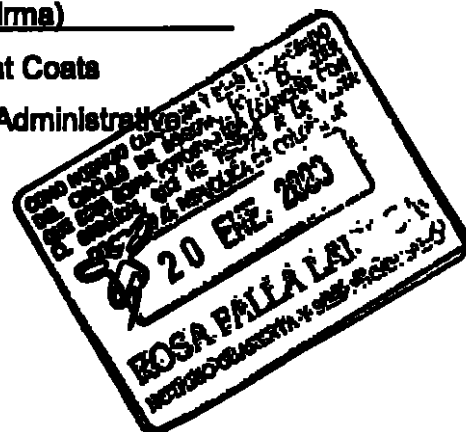
5. en Oklahoma City, Oklahoma, Estados Unidos de América
6. El 20 de diciembre de 2005
7. por el Técnico Administrativo
8. No. C00023984
9. Sello/timbre del Estado de Oklahoma

10. Firma

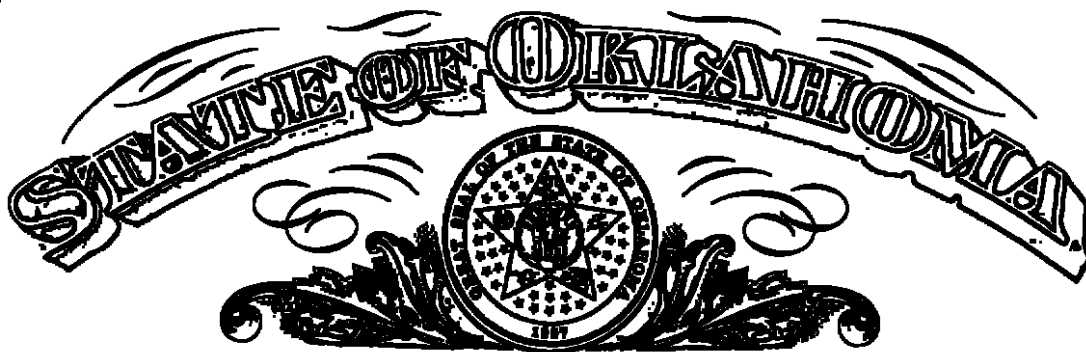
(Firma)

Pat Coats

Técnico Administrativo



OFFICE OF THE SECRETARY OF STATE



APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: *United States of America*

This public document

2. Has been signed by *Jamie A. Robinson*

3. Acting in the capacity of *Notary Public, State of Oklahoma*

4. Bears the seal/stamp of *Jamie A. Robinson, Notary Public*

CERTIFIED

5. At *Oklahoma City, Oklahoma, U.S.A.*

6. The *20th* day of *December, 2005*

7. By *Administrative Technician*

8. No. *600023263*



10. Signature:

Pat Coats

Pat Coats
Administrative Technician

f 100

STATE OF OKLAHOMA)
) ss.
COUNTY OF TULSA)

I certify that the attached document is a true and correct copy of the ASSIGNMENT from JOSE DE JESUS DE LA FUENTE, KATHERINE M. KOCAN, CONSUELO GARCIA-ALMAZAN, and EDMOUR F. BLOUIN, (as Assignors) to THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY (as Assignee) wherein Assignors assigned all their right, title and interest in and to the invention entitled "PROTECTIVE ANTIGENS AND VACCINES FOR THE CONTROL OF MULTI SPECIES TICK INFESTATIONS" to Assignee, recorded with the United States Patent and Trademark office on December 16, 2005, at Reel 016907, Frame 0161, which original document I have seen.

Dated: December 19, 2005 Jamie A Robinson
 Jamie A. Robinson, Notary Public



#337333 v1

05-467 CO



4 101

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICEUNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

DECEMBER 16, 2005

PTAS

500066263AR. ALAN WEEKS
321 S. BOSTON AVE., SUITE 800
TULSA, OK 74103-3318***500066263A*****UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT**

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT SERVICES DIVISION, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 12/16/2005

REEL/FRAME: 016907/0161
NUMBER OF PAGES: 5BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).
DOCKET NUMBER: 03300-57338 (04-597)

ASSIGNOR:

DE LA FUENTE, JOSE DE JESUS

DOC DATE: 10/26/2005

ASSIGNOR:

KOCAN, KATHERINE M.

DOC DATE: 10/26/2005

ASSIGNOR:

GARCIA-ALMAZAN, CONSUELO

DOC DATE: 12/07/2005

ASSIGNOR:

BLOUIN, EDMOUR F.

DOC DATE: 10/26/2005

102

016907/0161 PAGE 2

ASSIGNEE:

THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA
STATE UNIVERSITY
STUDENT UNION BUILDING
STILLWATER, OKLAHOMA 74078

SERIAL NUMBER: 10972789

FILING DATE: 10/25/2004

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: PROTECTIVE ANTIGENS AND VACCINES FOR THE CONTROL OF MULTI SPECIES
TICK INFESTATIONS

ASSIGNMENT DIVISION

OFFICE OF PUBLIC RECORDS

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

12/16/2005
500066263

SUBMISSION TYPE:

NEW ASSIGNMENT

NATURE OF CONVEYANCE:

ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
José de Jesus de la Fuente	10/28/2005
Katherine M. Kocan	10/28/2005
Consuelo Garcia-Almazan	12/07/2005
Edmour F. Blouin	10/28/2005

RECEIVING PARTY DATA

Name:	The Board of Regents for Oklahoma State University
Street Address:	Student Union Building
City:	Stillwater
State/Country:	OKLAHOMA
Postal Code:	74078

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	10972789

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (918)583-8659

Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.

Phone: (918) 588-0621

Email: patents@fallersnyder.com

Correspondent Name: R. Alan Weeks

Address Line 1: 321 S. Boston Ave., Suite 800

Address Line 4: Tulsa, OKLAHOMA 74103-3318

ATTORNEY DOCKET NUMBER:

O3300-57338 (04-597)

NAME OF SUBMITTER:

R. Alan Weeks

Total Attachments: 3

source=10972789#page1.tif

02834000-10972789

source=10972788#page2.tif

source=10972788#page3.tif

XZ 10A

ASSIGNMENT

WHEREAS, JOSE DE JESUS DE LA FUENTE, residing at 400 Squires Landing, Apt. M-5, Stillwater, OK 74074; KATHERINE M. KOCAN, residing at 3909 E. 92nd Street, Perkins, OK 74059; CONSUELO GARCIA-ALMAZAN, residing at Prol. Aldama 1424, Frac. La Sierra, Cd. Victoria, Tam. CP 87037, Mexico; and EDMOUR F. BLOUIN, residing at 3909 E. 92nd Street, Perkins, OK 74059, (hereinafter referred to as "ASSIGNORS") are co-inventors of a certain new and useful invention entitled "PROTECTIVE ANTIGENS AND VACCINES FOR THE CONTROL OF MULTI SPECIES TICK INFESTATIONS" for which a utility application for Letters Patent of the United States was filed on October 25, 2004, as Serial No. 10/972,789, which application is a continuation-in-part of utility application Serial No. 10/425,563, filed on April 29, 2003, which application claims the benefit of prior filed provisional application Serial No. 60/376,251; and

WHEREAS, THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY, an institution of higher education located at Stillwater, Oklahoma, (hereinafter referred to as "ASSIGNEE") is desirous of acquiring the entire right, title and interest of ASSIGNORS in and to the aforementioned invention and application, and in, to and under any and all Letters Patent of the United States and in any and all foreign countries; and in fact has acquired such rights by virtue of the prior assignment by ASSIGNORS to ASSIGNEE of the subject matter of the above-identified provisional application;

NOW, THEREFORE, this indenture witnesseth that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, ASSIGNORS, the inventors, have sold, assigned, transferred and set over and do hereby sell, assign, transfer and set over to ASSIGNEE, the above-referenced invention and application and any and all divisions, continuations and continuations-in-part thereof, and any and all Letters Patent of the United States, its territorial possessions, and any and all foreign countries which may be granted therefor, and any and all extensions, reissues or certificates of reexamination of such Letters Patent, including all rights of priority and the subject matter of any and all claims which may be obtained in every such patent, the same to be held and enjoyed by ASSIGNEE for its own use and benefit, and for the use and benefit of its successors, assigns or other legal representatives, to the end of the term or terms for which such Letters Patent are or may be granted, extended, reissued or reexamined as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by ASSIGNORS if this assignment had not been made.

AND, ASSIGNORS hereby authorize and request the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States on the invention, or resulting from an application which claims the benefit of the present application, and from any and all divisions and continuations, extensions, reissues or reexaminations of any such application to ASSIGNEE, and

106

PATENT

Attorney Docket No. 57338/04-597

Assignment

Page 2

hereby covenant that they have full right to convey the entire interest herein assigned, and that they have not executed and will not execute any agreement in conflict herewith.

AND, ASSIGNORS further hereby covenant and agree that they will, at any time, upon request and at the expense of ASSIGNEE, execute and deliver any and all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to the invention and application and any Letters Patent as may be granted therefor in ASSIGNEE, its successors, assigns, or other legal representatives, and that if ASSIGNEE, its successors, assigns, or other legal representatives shall desire to file any division or continuation application, or to secure an extension, reissue or reexamination of such Letters Patent, or to file a disclaimer relating thereto, will, upon request, sign all papers, make all rightful oaths, and do all requisite acts for the filing of such division, continuing, or reissue application, request for reexamination or disclaimer, without further compensation.

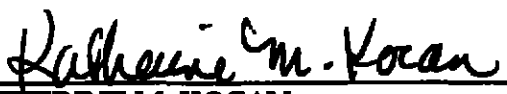
AND, ASSIGNORS further agree to communicate to ASSIGNEE, its successors, assigns, or other legal representatives, such facts relating to the invention disclosed in the present application or Letters Patent issuing therefrom as may be known, and to testify as to such facts in any interference or other litigation when requested to do so.

Executed by the undersigned on the date indicated.



10-26-05

JOSE DE JESUS DE LA FUENTE Date



10-26-05

KATHERINE M. KOCAN Date

CONSUELO GARCIA-ALMAZAN Date



10/26/05

EDMOUR F. BLOUIN Date

X 107

hereby covenant that they have full right to convey the entire interest herein assigned, and that they have not executed and will not execute any agreement in conflict herewith.

AND, ASSIGNORS further hereby covenant and agree that they will, at any time, upon request and at the expense of ASSIGNEE, execute and deliver any and all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to the invention and application and any Letters Patent as may be granted therefor in ASSIGNEE, its successors, assigns, or other legal representatives, and that if ASSIGNEE, its successors, assigns, or other legal representatives shall desire to file any division or continuation application, or to secure an extension, reissue or reexamination of such Letters Patent, or to file a disclaimer relating thereto, will, upon request, sign all papers, make all rightful oaths, and do all requisite acts for the filing of such division, continuing, or reissue application, request for reexamination or disclaimer, without further compensation.

AND, ASSIGNORS further agree to communicate to ASSIGNEE, its successors, assigns, or other legal representatives, such facts relating to the invention disclosed in the present application or Letters Patent issuing therefrom as may be known, and to testify as to such facts in any interference or other litigation when requested to do so.

Executed by the undersigned on the date indicated.

JOSE DE JESUS DE LA FUENTE Date

KATHERINE M. KOCAN Date

 Dec 107/05

CONSUELO GARCIA-ALMAZAN Date

EDMOUR F. BLOUIN Date

108

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del Documento de Cesión a The Board of Regents for Oklahoma State University firmado por los cedentes y el Cesionario

**OFICINA DEL SECRETARIO DE ESTADO
ESTADO DE OKLAHOMA**

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. Ha sido firmado por Jamie A. Robinson
3. Actuando en capacidad de notario público, Estado de Oklahoma
4. Lleva el sello/timbre de Jamie A. Robinson, notario público

Certificado

5. en Oklahoma City, Estado de Oklahoma
6. el 20 de diciembre de 2005
7. por el técnico administrativo
8. NO C00023963
9. Sello/timbre del Estado de Oklahoma

10. Firma:

(Firma)

Pat Coats

Técnico Administrativo

109

ESTADO DE OKLAHOMA)

) ss.

CONDADO DE TULSA)

Yo certifico que el documento anexo es una copia verdadera y correcta de la CESIÓN de JOSE DE JESUS DE LA FUENTE, KATHERINE M. KOCAN, CONSUELO GARCIA-ALMAZAN, y EDMOUR F. BLOUIN (como Cedentes) a THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY (como Cesionario) en donde los Cedentes ceden todo su derecho, título e interés en y para la invención titulada "ANTÍGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE INFESTACION DE MÚLTIPLES ESPECIES DE GARRAPATAS" al Cesionario, registrado con la Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos en Diciembre 16 de 2005, en el rollo 016907, cuadro 0161, del cual he visto el documento original.

Fechado: Diciembre 19 de 2005

(Firma)

Jamie A. Robinson, notario público

Hay un sello que dice:

JAMIE A. ROBINSON

NOTARIO PUBLICO

#01016710

VENCE 11/08/09

ESTADO DE OKLAHOMA

28 110

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE ESTADOS UNIDOS

DICIEMBRE 16 DE 2005

**R. ALAN WEEKS
321 S. BOSTON AVE., SUITE 800
TULSA, OK 74103-3318**

**OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS
INFORME DE GRABACIÓN DE DOCUMENTO DE CESION**

EL DOCUMENTO ADJUNTO HA SIDO GRABADO POR LA DIVISIÓN DE CESIONES DE LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS. HAY DISPONIBLE UNA COPIA COMPLETA EN MICROFILME EN EL CUARTE DE BÚSQUEDA DE CESIONES EN EL NÚMERO DE ROLLO Y CUADRO REFERENCIADOS ABAJO.

POR FAVOR REVISE TODA LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE INFORME. LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE INFORME DE GRABACIÓN REFLEJA LOS DATOS PRESENTES EN EL SISTEMA DE ASIGNACIÓN DE PATENTES Y MARCAS. SI USTED ENCUENTRA CUALQUIER ERROR O TIENE PREGUNTAS CONCERNIENTES A ESTE INFORME, PUEDE CONTACTAR AL EMPLEADO CUYO NOMBRE APARECE EN ESTE INFORME AL 703-308-9723. POR FAVOR ENVÍE LA SOLICITUD DE CORRECCIÓN A: OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS, DIVISIÓN DE CESIONES, ASIGNACIÓN DE CASILLAS, CG-4, 1213 JEFFERSON DAVIS HWY, SUITE 320, WASHINGTON, D.C.20231.

**FECHA DE GRABACIÓN: 12/16/2005 ROLLO/CUADRO: 019607/0181
NÚMERO DE PÁGINAS: 5**

**RESUMEN: CESIÓN DE INTERÉS DEL CEDENTE (VER DOCUMENTO PARA DETALLES).
NUMERO DE EXPEDIENTE: 03300-57338 (04-597)**

CEDENTE:		
DE LA FUENTE, JOSE DE JESUS	FECHA DE DOC:	10/26/2005
CEDENTE:		
KOCAN KATHERINE M.	FECHA DE DOC:	10/26/2005
CEDENTE:		
GARCIA-ALMAN, CONSUELO	FECHA DE DOC:	12/07/2005
CEDENTE:		
BLOUIN, EDMOUR F.	FECHA DE DOC:	10/26/2005

HA III

019607/0161 PAGINA 2

CESIONARIO:

**THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA
STATE UNIVERSITY
STUDENT UNION BUILDING
STILLWATER, OKLAHOMA 74078**

NÚMERO DE SERIE: 10972789 FECHA DE PRESENTACIÓN: 10/25/2004

NÚMERO DE PATENTE: FECHA DE EMISIÓN:

**TÍTULO: ANTÍGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE
INFESTACIONES DE MÚLTIPLES ESPECIES DE GARRAPATAS**

**DIVISIÓN DE CESIONES
OFICINA DE REGISTROS PÚBLICOS**

112

CESIÓN DE PATENTE

Versión electrónica v1.1 12/16/2005
 Versión de estilo v1.1 500066263

TIPO DE PRESENTACIÓN	CESIÓN NUEVA
NATURALEZA DEL TRASPASO	CESIÓN

DATOS DE LAS PARTES CEDENTES	
Nombre	Fecha de ejecución
Jose de Jesús de la Fuente	10/28/2005
Katherine M. Kocan	10/28/2005
Consuelo Garcia-Almazan	10/07/2005
Edmour F. Blouin	10/28/2005

DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE	
Nombre:	The Board of regents for Oklahoma State University
Dirección:	Student Union Building
Ciudad:	Stillwater
Estado/Condado:	OKLAHOMA
Código postal:	74078

NUMERO DE PROPIEDADES Total: 1	
Tipo de propiedad	Número
Número de solicitud:	10872789

DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Número de fax:	(918) 583-9659
<i>La correspondencia se enviará por Correo de Estados Unidos</i>	
Teléfono:	(918) 583-0821
Correo electrónico:	patents@tellersnider.com
Nombre del correspondiente:	R. Alan Weeks
Dirección línea 1:	321 S. Boston Ave., Suite 800
Dirección línea 4:	Tulsa, OKLAHOMA 74103-3318

NUMERO DE EXPEDIENTE DE ABOGADO	03300-57338 (04-597)
NOMBRE DE SOLICITANTE	R. Alan Weeks
Total anexos: 3	
fuente = 10872789#página1.kf	

2/13

fuentes = 10872789#página2.tif

fuentes = 10872789#página3.tif

14

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, JOSE DE JESUS DE LA FUENTE, residiendo en 400 Squires Landing, Apt. M-5, Stillwater, OK 74074; KATHERINE M. KOCAN, residiendo en 3909 E. 92nd Street, Perkins, OK 74059; CONSUELO GARCIA-ALMAZAN, residiendo en Prol. Aldama 1424, Frac. La Sierra, Cd. Victoria, Tam. CP 87037, Méjico; y EDMOUR F. BLOUIN, residiendo en 3909 E. 92nd Street, Perkins, OK 74059, (en adelante referidos como "CEDENTES") son coinventores de cierta invención nueva y útil titulada "ANTÍGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE MÚLTIPLES ESPECIES DE GARRAPATAS" para la cual se presentó solicitud de patente de estados Unidos en octubre 25 de 2004, como número de serie 10/972,789, solicitud que es una continuación parcial de la solicitud de utilidad número de serie 10/425,563, presentada en abril 29 de 2003, solicitud que reclama el beneficio de la solicitud provisional presentada con anterioridad número de serie 60/376,251; y

CONSIDERANDI QUE, THE BOEARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY, una institución de educación superior localizada en Stillwater, Oklahoma (en adelante referido como "CESIONARIO") esta deseoso de adquirir la totalidad del derecho, título e interés de los CEDENTES en y para la invención y solicitud arriba mencionadas, y en, para y bajo cualquiera y todas las patentes de Estados Unidos y en y todos los países extranjeros; y de hecho ha adquirido tales derechos por virtud de la cesión anterior por los CEDENTES al CESIONARIO de la materia de la solicitud provisional arriba mencionada;

AHORA, POR LO TANTO, esta escritura da testimonio de la consideración buena y valiosa, el recibo y suficiencia de la cual se reconoce por la presente, los CEDENTES, los inventores, han vendido, cedido, transferido y traspasado y por la presente venden, ceden, trasfieren y traspasan al CESIONARIO la invención y solicitud arriba referidas y cualquiera y todas las divisiones, continuaciones y continuaciones parciales de las mismas, y cualquiera y todas las patentes de estados Unidos, sus posesiones territoriales, y cualquiera y todos los países extranjeros que hallan concedido las mismas, y cualquiera y todas las extensiones, remisiones o certificados de reexaminación de tales patentes, incluyendo todos los derechos de prioridad y la materia de cualquiera y todas las reivindicaciones que se obtengan en todas tales patentes, las mismas serán tenidas y disfrutadas por el CESIONARIO para su propio uso y beneficio, y para el uso y beneficio de sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales, hasta el fin del término o términos para los cuales se concedan o puedan concederse, extenderse, reemitirse o reexaminarse tales patentes, tan completa y enteramente como se tendrían y disfrutarían los mismos por los CEDENTES si esta cesión no hubiere sido hecha.

Y, LOS CEDENTES por la presente autorizan y solicitan al Comisionado de patentes a emitir cualquiera y todas las patentes de Estados Unidos sobre la invención, o que resulten de una solicitud la cual reclame el beneficio de la presente solicitud, y de todas y cualquier división y continuación, extensión, reemisión o reexamen de cualquier tal solicitud al CESIONARIO, y

por la presente garantizan que tiene pleno derecho para transferir e interés aquí
cedido, y que no han ejecutado y no ejecutarán ningún acuerdo en conflicto con éste.

Y, LOS CEDENTES además garantizan y acuerdan por la presente que, en cualquier
momento, por solicitud y a costas del CESIONARIO, ejecutarán y entregarán cualquiera y
todos los documentos que puedan ser necesarios o deseables para perfeccionar el título de la
invención y la solicitud y cualquier patente que pueda ser concedida por la misma la
CESIONARIO, sus sucesores, u otros representantes legales, y que si el CESIONARIO, sus
sucesores, u otros representantes legales desean presentar cualquier solicitud de división o
continuación, o para asegurar una extensión, reemisión o reexamen de tales patentes, o
presentar un abandono relacionado con ellas, por solicitud, firmarán todos los documentos,
harán todos los juramentos apropiados, y realizarán todos los actos requeridos para la
presentación de tal solicitud de división, continuación o reemisión, solicitarán el reexamen o el
abandono, sin compensación adicional.

Y, LOS CEDENTES además acuerdan comunicar al CESIONARIO, sus sucesores,
cesionarios, u otros representantes legales, tales hechos relacionados con la invención
divulgada en la presente solicitud o la patente que salga de la misma que puedan conocer, y
testificar en cuanto a dichos hechos en cualquier interferencia u otro litigio cuando así se les
solicite.

Ejecutada por los suscritos en la fecha indicada.

(Firma) 10-26-05
JOSE DE JESUS DE LA FUENTE Fecha

(Firma) 10-26-05
KATHERINE M. KOCAN Fecha

CONSUELO GARCIA-ALMAZAN Fecha

(Firma) 10/26/05
EDMOUR F. BLOUIN Fecha

24 116

por la presente garantizan que tiene pleno derecho para transferir e interés aquí
cedido, y que no han ejecutado y no ejecutarán ningún acuerdo en conflicto con ésta.

Y, LOS CEDENTES además garantizan y acuerdan por la presente que, en cualquier
momento, por solicitud y a costas del CESIONARIO, ejecutarán y entregarán cualquiera y
todos los documentos que puedan ser necesarios o deseables para perfeccionar el título de la
invención y la solicitud y cualquier patente que pueda ser concedida por la misma la
CESIONARIO, sus sucesores, u otros representantes legales, y que si el CESIONARIO, sus
sucesores, u otros representantes legales desean presentar cualquier solicitud de división o
continuación, o para asegurar una extensión, reemisión o reexamen de tales patentes, o
presentar un abandono relacionado con ellas, por solicitud, firmarán todos los documentos,
harán todos los juramentos apropiados, y realizarán todos los actos requeridos para la
presentación de tal solicitud de división, continuación o reemisión, solicitarán el reexamen o el
abandono, sin compensación adicional.

Y, LOS CEDENTES además acuerdan comunicar al CESIONARIO, sus sucesores,
cesionarios, u otros representantes legales, tales hechos relacionados con la Invención
divulgada en la presente solicitud o la patente que salga de la misma que puedan conocer, y
testificar en cuanto a dichos hechos en cualquier interferencia u otro litigio cuando así se les
solicite.

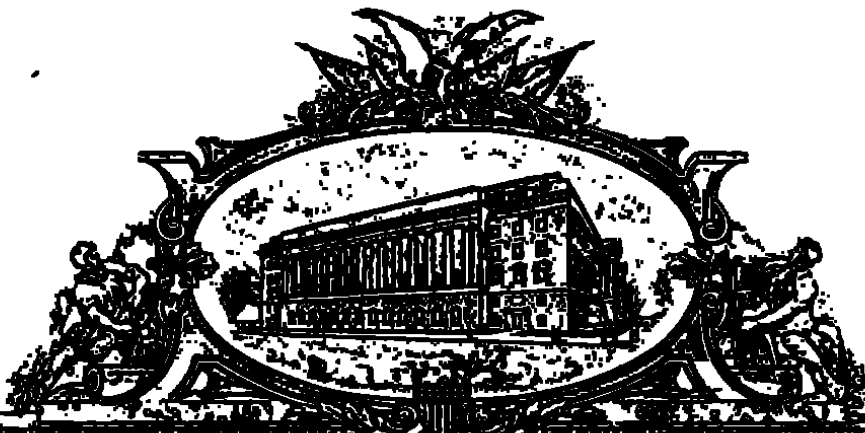
Ejecutada por los suscritos en la fecha indicada.

JOSE DE JESUS DE LA FUENTE Fecha

KATHERINE M. KOCAN Fecha

(Firma) Dic/07/05
CONSUELO GARCIA-ALMAZAN Fecha

EDMOUR F. BLOUIN Fecha



76 117

PA 1410277

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

December 30, 2005

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 10/972,789

FILING DATE: October 25, 2004

THE COUNTRY CODE AND NUMBER OF YOUR PRIORITY APPLICATION, TO BE USED FOR FILING ABROAD UNDER THE PARIS CONVENTION, IS US10/972,789

**By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office**



**P. SWAIN
Certifying Officer**



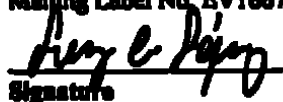
PATENT

Docket No.: 57338/04-597

Page 1 of 8

22276 U.S. PTO
10/972789**CERTIFICATION UNDER 37 C.F.R. AND 1.10**

I hereby certify that, on the date shown below, this correspondence is being deposited with the United States Postal Service in an envelope addressed to: Mail Stop Patent Application, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 as "Express Mail Post Office to Address" Mailing Label No. EV166756583US on October 23, 2004.



Signature

LUZ C. LOPEZ

(type or print name of person certifying)

Preliminary Classification:**Proposed Class:****Subclass:**

NOTE: "All applicants are requested to include a preliminary classification on newly filed patent applications. The preliminary classification, preferably class and subclass designations, should be identified in the upper right-hand corner of the letter of transmittal accompanying the application papers, for example "Proposed Class 2, subclass 129." M.P.E.P. Section 601, 7th ed.

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Mail Stop Patent Application
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

NEW APPLICATION TRANSMITTAL

Transmitted herewith for filing is the patent application of

Inventor(s): José de Jesús DE LA FUENTE
Katherine M. KOCAN
Consuelo GARCIA-ALMAZAN
Edmour F. BLOUIN

For (title): PROTECTIVE ANTIGENS AND VACCINES FOR THE CONTROL OF
MULTI SPECIES TICK INFESTATIONS

1. Type of Application

This new application is for a(n)

- ☐ Original (non-provisional)
- ☐ Design
- ☐ Plant
- ☐ Divisional.
- ☐ Continuation.
- ☒ Continuation-in-part (C-I-P).

2. Benefit of Prior U.S. Application(s) (35 U.S.C. Sections 119(e), 120, or 121)

- ☒ The new application being transmitted claims the benefit of prior U.S. application(s). This application is a continuation-in-part of corresponding application Serial No. 10/425,563, filed 04/29/2003; which in part is a non-provisional of corresponding application Serial No. 60/376,251, filed 04/29/2002.

3. Papers Enclosed

A. Required for Filing Date under 37 C.F.R. Section 1.53(b) (Regular) or 37 C.F.R. Section 1.153 (Design) Application

- 36 Pages of Specification
- 6 Pages of Claims
- 1 Pages of Abstract
- 4 Sheets of Drawing [Formal]

- ☐ The enclosed drawing(s) are photograph(s), and there is also attached a "PETITION TO ACCEPT PHOTOGRAPH(S) AS DRAWING(S)." 37 C.F.R. Section 1.84(b).

- ☐ Formal
- ☐ Informal

B. Other Papers Enclosed

- Pages of declaration and power of attorney
- Pages of assignment
- Nonpublication Request and Certification under 35 U.S.C. 122 (b)(2)(B)(i)
- ☒ Initial Application Data Sheet (4 pg)
- None
- Other

120

4. Additional Papers Enclosed

- ☐ Amendment to claims
 - ☐ Cancel in this applications claims _____ before calculating the filing fee.
(At least one original independent claim must be retained for filing purposes.)
 - ☐ Add the claims shown on the attached amendment. (Claims added have been numbered consecutively following the highest numbered original claims.)
- ☐ Preliminary Amendment
- ☐ Information Disclosure Statement (37 C.F.R. Section 1.98)
- ☐ Form PTO-1449 (PTO/SB/08A and 08B)
- ☐ Citations
- ☐ Declaration of Biological Deposit
- ☒ Submission of "Sequence Listing," computer readable copy and/or amendment pertaining thereto for biotechnology invention containing nucleotide and/or amino acid sequence.
 - ☒ NOTE: I hereby state that the information recorded in computer readable form is identical to the written (on paper or compact disc) sequence listing.
See 37 CFR 1.821(f).
- ☐ Authorization of Attorney(s) to Accept and Follow Instructions from Representative
- ☐ Special Comments
- ☐ Other

5. Declaration or Oath (including power of attorney)

- ☐ Enclosed Executed by
 - ☐ inventor(s).
 - ☐ legal representative of inventor(s). 37 C.F.R. Section 1.42 or 1.43.
 - ☐ joint inventor or person showing a proprietary interest on behalf of inventor who refused to sign or cannot be reached.
 - ☐ This is the petition required by 37 C.F.R. Section 1.47 and the statement required by 37 C.F.R. Section 1.47 is also attached. See item 13 below for fee.
- ☒ Not Enclosed.
 - ☐ Application is made by a person authorized under 37 C.F.R. 1.41 on behalf of *all* the above named inventor(s).
 - ☐ Showing that the filing is authorized.

121

6. Language

- ☒ English
☐ Non-English

- ☐ The attached translation includes a statement that the translation is accurate. 37 C.F.R. Section 1.52(d).

7. Assignment

- ☒ An assignment of the invention to

- ☐ is attached. A separate

- ☐ "COVER SHEET FOR ASSIGNMENT (DOCUMENT) ACCOMPANYING NEW PATENT APPLICATION" or

- ☐ FORM PTO 1595 is also attached.

- ☐ will follow.

- ☒ Assignment previously recorded on 07/14/2003 at Reel 014258 / Frame 0067.

8. Certified Copy

Certified copy(ies) of application(s)

Country:

Application No.:

Filed:

from which priority is claimed

- ☐ is (are) attached.

- ☐ will follow.

122

9. Fee Calculation (37 C.F.R. Section 1.16)

A. ☒ Regular application

CLAIMS AS FILED

Claims	Number Filed	Basic Fee Allowance	Number Extra	Rate	Basic Fee 37 C.F.R. Section 1.16(a) \$790.00
Total Claims (37 C.F.R. Section 1.16(c))	53	- 20 =	33 x	\$ 18.00	594.00
Independent Claims (37 C.F.R. Section 1.16(b))	10	- 3 =	x	\$ 88.00	880.00
Multiple Dependent Claim(s), if any (37 C.F.R. Section 1.16(d))			x	\$300.00	.00

- ☐ Amendment cancelling extra claims is enclosed.
- ☐ Amendment deleting multiple-dependencies is enclosed.
- ☐ Fee for extra claims is not being paid at this time.

Filing Fee Calculation \$ 2,264.00

B. ☐ Design application (\$340.00—37 C.F.R. Section 1.16(f))
Filing Fee Calculation \$ _____

C. ☐ Plant application (\$530.00—37 C.F.R. Section 1.16(g))
Filing Fee Calculation \$ _____

3/ 123

10. Small Entity Statement(s)

☐ Small entity statement is claimed at this time.

☒ Small entity statement is not claimed at this time.

Filing Fee Calculation (50% of A, B or C above) \$ 2,264.00

11. Request for International-Type Search (37 C.F.R. Section 1.104(d))

(complete, if applicable)

☐ Please prepare an international-type search report for this application at the time when national examination on the merits takes place.

12. Fee Payment Being Made at This Time

☒ Not Enclosed

☒ No filing fee is to be paid at this time.

☐ Enclosed

☐ Filing fee \$ _____

☐ Recording assignment
(\$40.00; 37 C.F.R. Section 1.21(h))
(See attached "COVER SHEET FOR
ASSIGNMENT ACCOMPANYING NEW
APPLICATION.") \$ _____

☐ Petition fee for filing by other than all the
inventors or person on behalf of the inventor where
inventor refused to sign or cannot be reached
(\$130.00; 37 C.F.R. Sections 1.47 and 1.17(I)) \$ _____

☐ For processing an application with a
specification in a non-English language
(\$130.00; 37 C.F.R. Sections 1.52(d) and 1.17(k)) \$ _____

20 124

- ☐ Processing and retention fee
(\$130.00; 37 C.F.R. Sections 1.53(d) and 1.21(l)) \$_____
- ☐ Fee for international-type search report
(\$40.00; 37 C.F.R. Section 1.21(e)) \$_____
- Total Fees Enclosed \$_____

13. Method of Payment of Fees

- ☐ Check in the amount of \$_____.
- ☐ Charge Account No. _____ in the amount of \$_____.
- ☐ A duplicate of this transmittal is attached.

14. Authorization to Charge Additional Fees

- ☐ The Commissioner is hereby authorized to charge the following additional fees by this paper and during the entire pendency of this application to Account No..
- ☐ 37 C.F.R. Section 1.16(a), (f) or (g) (filing fees)
- ☐ 37 C.F.R. Section 1.16(b), (c) and (d) (presentation of extra claims)
- ☐ 37 C.F.R. Section 1.16(e) (surcharge for filing the basic filing fee and/or declaration on a date later than the filing date of the application)
- ☐ 37 C.F.R. Section 1.17(a)(1)-(5) (extension fees pursuant to Section 1.136(a).
- ☐ 37 C.F.R. Section 1.17 (application processing fees)
- ☐ 37 C.F.R. Section 1.18 (issue fee at or before mailing of Notice of Allowance, pursuant to 37 C.F.R. Section 1.311(b))

15. Instructions as to Overpayment

- ☐ Credit Account No. _____
- ☐ Refund

16. Correspondence Address

Customer No. 22206

43 125

PATENT
Docket No.: 57338/04-597
Page 8 of 8

Respectfully submitted,

RAW

SIGNATURE OF PRACTITIONER

R. Alan Weeks
(type or print name of practitioner)

321 S. Boston Ave., Suite 800
P.O. Address

Tulsa, OK 74103-3318

10/25/04

DATE

Reg. No.: 36,050

Tel. No.: (918) 599-0621

Customer No.: 22206

284086.1

34 126

INITIAL APPLICATION DATA SHEET

Application Information

Application Type:: Regular
Subject Matter:: Utility
Suggested Classification::
Suggested Group Art Unit::
Sequence submission?:: Paper
Computer Readable Form (CRF)?:: Yes
Number of copies of CRF:: One
Title:: Protective antigens and vaccines for the control of
multi species tick infestations
Attorney Docket Number:: 57338/04-587
Request for Early Publication:: No
Request for Non-Publication:: No
Suggested Drawing Figure::
Total Drawing Sheets:: 4
Small Entity?:: No
Petition Included?:: No
Secrecy Order in Parent Appl.?:: No

Applicant Information

Applicant One Authority Type:: Inventor
Primary Citizenship Country:: Cuba
Status:: Full Capacity
Given Name:: José de Jesús
Family Name:: de la Fuente
City of Residence:: Stillwater
State or Province of Residence:: OK
Country of Residence:: USA

37 122

Street of mailing address:: 400 Squires Landing, Apt. M-5
City of mailing address:: Stillwater
State or Province of mailing address:: OK
Country of mailing address:: USA
Postal or Zip Code of mailing address:: 74074

Applicant Two Authority Type:: Inventor
Primary Citizenship Country:: USA
Status:: Full Capacity
Given Name:: Katherine M.
Family Name:: Kocan
City of Residence:: Perkins
State or Province of Residence:: OK
Country of Residence:: USA
Street of mailing address:: 3909 E. 92nd Street
City of mailing address:: Perkins
State or Province of mailing address:: OK
Country of mailing address:: USA
Postal or Zip Code of mailing address:: 74059

Applicant Three Authority Type:: Inventor
Primary Citizenship Country:: Mexico
Status:: Full Capacity
Given Name:: Consuelo
Family Name:: García-Almazán
City of Residence:: Stillwater
State or Province of Residence:: OK
Country of Residence:: USA
Street of mailing address:: 835 Connell
City of mailing address:: Stillwater

74 128

State or Province of mailing address:: OK
Country of mailing address:: USA
Postal or Zip Code of mailing address:: 74075

Applicant Four Authority Type:: Inventor
Primary Citizenship Country:: USA
Status:: Full Capacity
Given Name:: Edmour F.
Family Name:: Blouin
City of Residence:: Perkins
State or Province of Residence:: OK
Country of Residence:: USA
Street of mailing address:: 3909 E. 92nd Street
City of mailing address:: Perkins
State or Province of mailing address:: OK
Country of mailing address:: USA
Postal or Zip Code of mailing address:: 74059

Correspondence Information

Correspondence Customer No.: 22208

Representative Information

Representative Customer Number:	22208
---------------------------------	-------

Domestic Priority Information

Application:	Continuity Type::	Parent Application::	Parent Filing::
	Continuation-in-part	10/425,563	04/29/03
10/425,563	Non-Provisional of	60/376,251	04/29/02

25/129

Foreign Priority Information

Country::	Application Number::	Filing Date::	Priority Claimed::
			Yes or No

Assignee Information

Assignee Name:: The Board of Regents for Oklahoma State University

284140.1

130

PROTECTIVE ANTIGENS AND VACCINES FOR THE CONTROL OF MULTI SPECIES TICK INFESTATIONS

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application is a continuation-in-part of copending U.S. Patent Application Serial No. 10/425,563, filed April 29, 2003, which application claims the benefit of U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/376,251 filed April 29, 2002. Both noted priority applications are incorporated herein by reference.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Technical Field:

[0002] The present invention relates to the identification of protective antigens against tick infestations, gene sequences and encoded proteins for such antigens, related vaccines and methods useful to induce an immune response in mammals, which are protective against a broad range of tick species.

Background:

[0003] Ticks parasitize wild, domesticated animals and humans and transmit pathogens including fungi, bacteria, viruses and protozoan. Currently, ticks are considered to be second in the world to mosquitoes as vectors of human diseases, but they are considered to be the most important vector of pathogens in North America (Parola and Raoult, 2001). *Ixodes spp.* are distributed worldwide and act as vectors of human diseases caused by *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease), *Anaplasma phagocytophila* (human granulocytic ehrlichiosis), *Coxiella burnetii* (Q fever),

Francisella tularensis (tularemia), *B. afzelii*, *B. lusitanae*, *B. valaisiana* and *B. garinii*, *Rickettsia helvetica*, *R. japonica* and *R. australis*, *Babesia divergens* and tick-borne encephalitis (TBE) and Omsk Hemorrhagic fever viruses (Estrada-Peña and Jongejan, 1999; Parola and Raoult, 2001). Throughout eastern and southeastern United States and Canada, *I. scapularis* (the black legged tick) is the main vector of *B. burgdorferi* sensu stricto and *A. phagocytophila* (Estrada-Peña and Jongejan, 1999; Parola and Raoult, 2001). Besides *Ixodes*, other tick species of medical and veterinary importance include those of the genera *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* and *Boophilus*.

[0004] Control of tick infestations is difficult and often impractical for multi-host ticks such as *Ixodes* spp. Presently, tick control is effected by integrated pest management in which different control methods are adapted to one area or against one tick species with due consideration to their environmental effects. Control of ticks by vaccination, however, would avoid environmental contamination and selection of drug resistant ticks that result from repeated acaricide application (de la Fuente et al., 1998; Garcia-Garcia et al., 1999, de la Fuente and Kocan 2004). Anti-tick vaccines would also allow for inclusion of multiple antigens in order to target a broad range of tick species and for incorporation of pathogen-blocking antigens (de la Fuente and Kocan 2004).

[0005] Recently, vaccines have been developed against one-host *Boophilus* spp. (Willadsen, 1997; Willadsen and Jongejan, 1999; de la Fuente et al., 1999; 2000; de Vos et al., 2001; de la Fuente and Kocan 2004). The recombinant *B. microplus* BM86 gut antigen included in commercial vaccine formulations TickGARD (Hoechst Animal Health, Australia) and Gavac (Heber Biotec S. A., Havana, Cuba) also confers partial protection against phylogenetically related *Hyalomma* and *Rhipicephalus* tick genera (de

la Fuente et al., 2000; de Vos et al., 2001; de la Fuente and Kocan 2004). However, immunization with BM86 failed to protect against the more phylogenetically distant *Amblyomma* spp. (de Vos et al., 2001). These results suggest that using Bm86 or a closely related gene for the production of vaccines against *Ixodes* spp. or other tick genera phylogenetically distant from *Boophilus* spp. (Black and Piesman, 1994) could be impractical. Therefore, there remains a need to identify broad range vaccine candidates against tick infestations across phylogenetically distant species (de la Fuente and Kocan 2004).

[0006] In parent application Serial No. 10/425,563 we described the identification by ELI and sequence analysis of protective cDNA clones against experimental infestations with *I. Scapularis* in what was the first example of the application of ELI to arthropods and particularly to ticks (Almazán et al 2003 a,b). It was thought that these protective antigens, although identified for *I. scapularis*, might be cross protective between *Ixodes* species considering the high degree of conservation of gene sequences and protein function between species of the same genus.

[0007] Surprisingly, it has been discovered that certain of the protective antigens exhibit activity and are expressed across tick species, and in some circumstances across genera, thus making possible the use of these common antigens in broad range anti-tick vaccine formulations.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0008] In the parent application, numerous protective antigens derived from *I. scapularis* were identified and shown to possess protective properties against *I.*

133

scapularis tick infestations. Among these antigens were clones and associated polypeptides designated 4D8, 4F8 and 4E6. Herein the activity of these particular protective antigens is demonstrated to extend to other tick species, and, in the case of 4D8, 4F8 and 4E6 to non-*Ixodes* tick species. In addition, there is provided the recently discovered sequences (DNA and protein) of tick protective antigen 4D8 derived from genus *Rhipicephalus*, particularly *Rhipicephalus appendiculatus*.

[0009] Sequence conservation and expression of 4F8, 4D8 and 4E6 were analyzed in *I. scapularis* related species, *I. pacificus* and *I. ricinus*, and in *D. variabilis*, *R. sanguineus*, *B. microplus* and *A. americanum* by RT-PCR using the primers specific for the known *I. scapularis* sequences. Expression was detected in *I. ricinus* for all three genes and in *I. pacificus* for 4D8 and 4E6. Expression of 4D8 was also detected in *D. variabilis*, *B. microplus*, *R. sanguineus* and *A. americanum*. Corresponding 4D8 genes of *D. variabilis*, *A. americanum* and *B. microplus* were cloned and sequenced.

[0010] The detection of 4D8 and 4E6 expression in non-*Ixodes* tick species were the basis for an experiment in which rabbits were immunized with *I. scapularis* derived 4F8, 4D8 and 4E6 and challenged with *I. scapularis*, *D. variabilis* and *A. americanum* nymphs. Results support using the inventive protective antigens in vaccine formulations for the control of multiple tick species.

[0011] Accordingly, in one embodiment of the present invention there is provided cDNA sequences, protein encoding fragments thereof, and derived protein sequences for the multi-species protective antigens denominated 4F8, 4D8 and 4E6.

[0012] In another embodiment of the present invention there is provided a vaccine composition comprising the inventive protective recombinant proteins and/or

modified cDNAs separately or which may optionally be combined with adjuvant to enhance the protection efficacy of vaccine preparations against multiple tick species, wherein the vaccine composition further comprises a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. The vaccine composition also may optionally be combined with tick-borne pathogen components to provide a means to control tick-borne infections, wherein the vaccine composition further comprises a pharmaceutically acceptable carrier or diluent and adjuvant.

[0013] In another embodiment of the present invention there is provided a method for inducing an immune response in a mammal to provide immune protection, which reduces or affects infestations by target ticks and/or transmission of tick-borne pathogens, the method comprising administering to at-risk human population and mammalian reservoir an effective amount of a vaccine composition comprising the inventive protective recombinant proteins and/or modified cDNAs alone or in combination with an adjuvant or tick-borne pathogen components to provide a means to control tick infestations and to reduce transmission to humans of tick-borne infections, wherein the vaccine composition further comprises a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

[0014] A better understanding of the present invention and its objects and advantages will become apparent to those skilled in this art from the following detailed description, wherein there is described only the preferred embodiment of the invention, simply by way of illustration of the best mode contemplated for carrying out the invention. As will be realized, the invention is capable of modifications in various obvious respects, all without departing from the scope and spirit of the invention.

Accordingly, the description should be regarded as illustrative in nature and not as restrictive.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0015] FIG. 1 is a summary of the cDNA ELI approach used to identify protective antigens against *I. scapularis* infestations.

[0016] FIG. 2A is a graph depicting the results of a primary screen of cDNA pools (A-H 1-4, A5) by ELI. V, control mice injected with 1 μ g vector DNA alone. * α <0.01, ** α <0.05 (Tukey's *post-hoc* test for pair comparisons after ANOVA). Number in boxes represent values for inhibition of tick infestation with respect to the control group.

[0017] FIG. 2B is a graph depicting the results of a primary screen of cDNA pools (A6-A10, B-H 5-8) by ELI. V, control mice injected with 1 μ g vector DNA alone. * α <0.01, ** α <0.05 (Tukey's *post-hoc* test for pair comparisons after ANOVA). Number in boxes represent values for inhibition of tick infestation with respect to the control group.

[0018] FIG. 3 is a graph depicting the results of a tertiary screen by ELI of cDNA sub-pools formed according to the predicted function of encoded proteins. Only groups with $\geq 15\%$ are shown (white bars). The number of engorged larvae per mouse is expressed as mean $\pm$ SD (black bars). Control mice were injected with mitochondrial (MT) cDNAs. * P $\leq$ 0.05 (Student's t-test).

136

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0019] Before explaining the present invention in detail, it is important to understand that the invention is not limited in its application to the details of the construction illustrated and the steps described herein. The invention is capable of other embodiments and of being practiced or carried out in a variety of ways. It is to be understood that the phraseology and terminology employed herein is for the purpose of description and not of limitation.

[0020] In the parent application, there were provided 25 separate and distinct sequences comprising 14 cloned cDNA molecules and 11 deduced amino acid sequences of encoded polypeptides, said sequences having been isolated and identified as protective against *I. scapularis* in accordance with the following described experimental methodology.

Example 1: Construction of an I. scapularis cDNA library and screening for protective antigens by ELI

Tick cells

[0021] Monolayers of IDE8 (ATCC CRL 1973) cells, originally derived from embryonic *I. scapularis*, were maintained at 31°C in L-15B medium supplemented with 5% foetal bovine serum, tryptose phosphate broth and bovine lipoprotein concentrate after Munderloh et al. (1994). Cells were subcultured at 1:5 – 1:10 when monolayers reached a density of approximately 10⁷ cells/T-25 flask. Medium was replaced weekly.

Library construction

[0022] A cDNA expression library was constructed in the vector pEXP1 containing the strong cytomegalovirus CMV_{IE} promoter (Clontech). Because we planned to target the early larval stages of *I. scapularis*, we chose to construct our library from

✓
137

cultured embryonic *I. scapularis* IDE8 cells-derived poly(A)+ RNA. The cDNA library contained 4.4×10^6 independent clones and a titer of approximately 10^{10} cfu/ml with more than 93% of the clones with cDNA inserts. The average cDNA size was 1.7 kb (0.5-4.0 kb).

Primary screen

[0023] The overall schema for identification of protective antigens through ELI, sequential fractionation and sequence analysis is shown in Fig. 1.

[0024] Ninety-six LBA (master) plates containing an average of 41 (30-61) cDNA clones per plate were prepared. Replicas were made and clones from each plate were pooled, inoculated in Luria-Bertani with 50 µg/ml ampicillin, grown for 2 hr in a 96 wells plate and plasmid DNA purified from each pool (Wizard SV 96 plasmid DNA purification system, Promega, Madison, WI, USA). BALB/c female mice, 5-6 weeks of age at the time of first vaccination, were used. Mice were cared for in accordance with standards set in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Mice were injected with a 1 ml tuberculin syringe and a 27 gauge needle at days 0 and 14. Three mice per group were each immunized IM in the thigh with 1 µg DNA/dose in 50 µl PBS. Two groups of 3 mice each were included as controls. One group was injected with 1 µg vector DNA alone and the second with saline only. Two weeks after the last immunization, mice were infested with 100 *I. scapularis* larvae per mouse. Ticks were artificially reared at the Oklahoma State University tick rearing facility by feeding larvae on mice, nymphs on rabbits and adults on sheep and using for infestation in our experiments the larvae obtained from the eggs oviposited by a single female. Twelve hours after tick infestation, larvae that did not attach were counted to calculate the

number of attached larvae per mouse and mice were transferred to new cages. Replete larvae dropping from each mouse were collected daily and counted during 7 days. The inhibition of tick infestation (I) for each test group was calculated with respect to vector-immunized controls as $[1 - (\langle RL \rangle_n / \langle RL \rangle_c \times \langle RL \rangle_{ic} / \langle RL \rangle_{in})] \times 100$, where $\langle RL \rangle_n$ is the average number of replete larvae recovered per mouse for each test group, $\langle RL \rangle_c$ is the average number of replete larvae recovered per mouse for control group, $\langle RL \rangle_{ic}$ is the average number of larvae attached per mouse for control group, and $\langle RL \rangle_{in}$ is the average number of larvae attached per mouse for each test group.

[0025] Pools of 41 (30-61) *I. scapularis* cDNA clones were screened by ELI. Only 33 cDNA pools and controls were analyzed per experiment. The average tick infestation level was 50 ± 13 and 56 ± 15 and 56 ± 15 and 54 ± 18 larvae/mouse for cDNA immunized and control mice, respectively ($P > 0.05$) (Table 1). The average number of engorged larvae recovered per mouse was 9 ± 3 and 13 ± 4 in the cDNA-immunized mice and 16 ± 4 and 17 ± 3 in the control vector-immunized group ($P < 0.05$) (Table 1). No reduction was observed in the number of larvae collected from mice that received the vector DNA compared to saline-immunized controls. The maximum number of engorged larvae was collected 3 to 4 days after infestation. However, in mice immunized with cDNA pools B5, A8 and A10 (Fig. 2) a retardation of larval development in 1 to 2 days was recorded. The average inhibition of tick infestation (I) was $49 \pm 28\%$ and $30 \pm 22\%$ (Table 1). After two experiments covering the analysis of 66 pools (2705 clones), 9 protective pools (351 clones) were selected producing an inhibition of tick infestation $\geq 60\%$ (Fig. 2A and 2B and Table 1). When we started these experiments, we planed to screen over 4000 cDNA clones considering the complexity of the tick genome. However,

47 139

to our surprise 9 protective cDNA pools were identified after screening 66 pools containing 2705 cDNA clones. This result probably reflects the possibility of interfering with tick infestations at many different levels that involve a Pleiades of gene products. Results from vaccination experiments against ticks employing recombinant antigens support this view (reviewed by Mulenga et al., 2000). Because of the complexity of the screening procedure in mice vaccinated and challenged with tick larvae, it was difficult to work with more than 9 protective cDNA pools. Therefore we did not continue screening new cDNA pools and focused our attention on the 9 pools selected after the primary screen.

Secondary screen

[0026] The secondary screen was done to verify the protective capacity of the cDNA pools selected after the primary screen (Fig. 2A and 2B). After the primary screen of 66 cDNA pools (2705 clones), 9 pools with $\geq 60\%$ were selected for the secondary screen (re-screening) employing 5 mice per group as described above. Engorged larvae were kept for molting in a 95% humidity atmosphere. Molting of engorged larvae was evaluated by visual examination of tick nymphs under a stereomicroscope 34 days after last larval collection. The inhibition of molting (M) for each test group was calculated with respect to vector-immunized controls as $[1 - (ML_n/ML_c \times RL_c/RL_n)] \times 100$, where ML_n is the number of nymphs for each test group, ML_c is the number of nymphs for the control group, RL_c is the number of larvae recovered for the control group, and RL_i is the number of larvae recovered for each test group. Control mice were immunized with the negative (I=0%) F2 cDNA pool or saline only. A group was included immunized SC with

✓ 140

two doses of 100 µg of total IDE8 tick cell proteins per dose in Freund's incomplete adjuvant.

[0027] All 9 protective cDNA pools gave positive results in the secondary screen (data not shown). The tick infestation levels were higher in this experiment (average 85 ± 6 and 84 ± 3 larvae/mouse for cDNA-immunized and control mice, respectively; $P > 0.05$). Nevertheless, the average number of engorged larvae recovered per mouse was 39 ± 7 and 26 ± 6 for control and cDNA-immunized mice, respectively ($P < 0.05$). The group immunized with total IDE8 tick cell proteins was protected with $I = 33\%$. Again, no reduction was observed in the number of larvae collected from mice that received the control cDNA (F2 negative pool after the primary screen; Fig. 2A) compared to saline-immunized controls.

[0028] In the secondary screen, molting of engorged larvae was evaluated after 34 days. Molting was affected in all but one test cDNA-immunized group. Inhibition of molting in test cDNA-immunized mice compared to the control cDNA-immunized group varied from 0% to 12% ($6 \pm 4\%$). The inhibition of molting was higher than 50% only in the larvae collected from mice immunized with cDNA pools B5 and A10, which showed a retardation of larval development in 1 to 2 days as in the primary screen. No differences were observed between control cDNA and saline-immunized mice. Among the larvae that did not molt to nymph, some were visibly damaged and presented a strong red coloration. The percent of red larvae in cDNA-immunized mice varied between 3% to 18% ($7 \pm 5\%$) while in the saline and control cDNA-immunized groups red larvae represented the 6% and 4%, respectively.

Tertiary screen

141

[0029] For the tertiary screen, 64 clones were grouped in 16 sub-pools each containing 1 to 17 plasmids according to the predicted function of encoded proteins (e.g., all the plasmids that encoded histone proteins were grouped together) and used with 4 sub-pools containing 182 clones of unknown function or with sequences without homology to sequence databases to immunize 4 mice per group. Mice were immunized with 0.3 µg/plasmid/dose in 50 µl PBS and evaluated as described above. Control mice were immunized with a pool of 20 plasmids containing mitochondrial cDNAs.

[0030] Tick infestation levels were similar in all test groups (72 ± 2 larvae/mouse) and in control mice (69 ± 2 larvae/mouse) ($P > 0.05$). The number of engorged larvae recovered per mouse was also similar between test (16 ± 7) and control (14 ± 6) mice ($P > 0.05$). However, the groups immunized with cDNA sub-pools containing clones with putative endopeptidase, nucleotidase, ribosomal proteins, heat shock proteins, glutamine-alanine-rich proteins and 3 of the sub-pools with unknown function or with sequences without homology to sequence databases had $\geq 15\%$ (Fig. 3). Furthermore, among them, the groups immunized with sub-pools containing clones with a putative endopeptidase, nucleotidase and two of the cDNA sub-pools with unknown function or with sequences without homology to sequence databases resulted in lower infestation levels compared to control mice ($P \leq 0.05$) and $\geq 40\%$ (Fig. 3). Clones homologous to chorion proteins, vitellogenin receptors, and peptidoglycan recognition proteins were selected for their potential protection capacity in other stages of tick development.

Statistical analysis

[0031] The number of larvae attached per mouse and the number of engorged larvae recovered per mouse 7 days after infestation were compared by Analysis of

SP 142

Variance (ANOVA) followed by a series of Tukey's *post-hoc* tests for pair comparisons between cDNA-immunized and control vector DNA-immunized mice (primary screen), and by Student's t-test between mice immunized with positive cDNA pools and the control negative F2 cDNA pool (secondary screen) or between test cDNA sub-pools-immunized and control mice immunized with mitochondrial cDNAs (tertiary screen).

Example 2: Sequence analysis of protective clones

[0032] All the 351 cDNA clones in the 9 pools that resulted positive in the secondary screen were sequenced. DNA from individual clones in these pools was purified (Wizard SV 96 plasmid DNA purification system, Promega) from the master plate and partially sequenced. In most cases a sequence larger than 700 nucleotides was obtained. Nucleotide sequences were analyzed using the program AlignX (Vector NTI Suite V 5.5, InforMax, North Bethesda, MD, USA). BLAST (Altschul et al., 1990) was used to search the NCBI databases to identify previously cloned sequences that may have homology to those that we sequenced. Sequence analysis allowed grouping the clones according to sequence identity to DNA databases and predicted protein function. The protective clones selected after the tertiary screen were fully sequenced.

[0033] Comparison to sequence databases permitted to identify sequence identity to previously reported genes with known function in 152 (43%) of the clones (Table 2). Fifty seven percent of the sequences were homologous to genes with unknown function or had no significant identity to previously reported sequences (Table 2). Of the clones with sequence identity to genes with known function, 85% were homologous to arthropod sequences. Ninety-three clones (61%) contained sequences homologous to *Drosophila melanogaster*, 5 (3%) to other insects and 32 (21%) to Ixodid tick species.

56 143

Thirty percent of the clones were eliminated from further analysis based on their sequence identity, including those containing similar sequences (Table 2). The protective clones included antigens homologous to endopeptidases, nucleotidases, chorion proteins, vitellogenin receptors, peptidoglycan recognition proteins, glutamine-alanine rich proteins, ribosomal proteins, and heat-shock proteins.

Summary of results

[0034] The results obtained with the various protective clones identified in the Sequence Listing, along with certain selected expressed proteins, are summarized in Table 4.

[0035] SEQ ID NO:1 denotes the clone designated 4E6, wherein the relevant protein encoding fragment has been identified as comprising residues 1-117, which encodes the polypeptide shown in SEQ ID NO: 2.

[0036] SEQ ID NO:3 denotes the clone designated 4D8, wherein the relevant protein encoding fragment has been identified as comprising residues 80-575, which encodes the polypeptide shown in SEQ ID NO: 4.

[0037] SEQ ID NO:5 denotes the clone designated 4F8, wherein the relevant protein encoding fragment has been identified as comprising residues 1-951, which encodes the polypeptide shown in SEQ ID NO: 6.

[0038] SEQ ID NO:7 denotes the clone designated 4G11, wherein the relevant protein encoding fragment has been identified as comprising residues 1-697, which encodes the polypeptide shown in SEQ ID NO: 8.

2✓
144

[0039] SEQ ID NO:9 denotes the clone designated 4D6, wherein the relevant protein encoding fragment has been identified as comprising residues 198-1025, which encodes the polypeptide shown in SEQ ID NO: 10.

[0040] SEQ ID NO:11 denotes the clone designated 3E1, wherein the relevant protein encoding fragment has been identified as comprising residues 3-578, which encodes the polypeptide shown in SEQ ID NO: 12.

[0041] SEQ ID NO:13 denotes the clone designated 1C10, wherein the relevant protein encoding fragment has been identified as comprising residues 1-1119, which encodes the polypeptide shown in SEQ ID NO: 14.

[0042] SEQ ID NO:15 denotes the clone designated 3E10, wherein the relevant protein encoding fragment has been identified as comprising residues 51-1544, which encodes the polypeptide shown in SEQ ID NO: 16.

[0043] SEQ ID NO:17 denotes the clone designated 4F11, wherein the relevant protein encoding fragment has been identified as comprising residues 31-2295, which encodes the polypeptide shown in SEQ ID NO: 18.

[0044] SEQ ID NO:19 denotes the clone designated 3C12, wherein the relevant protein encoding fragment has been identified as comprising residues 6-332, which encodes the polypeptide shown in SEQ ID NO: 20.

[0045] SEQ ID NO:21 denotes the clone designated 2C12, wherein the relevant protein encoding fragment has been identified as comprising residues 3-137, which encodes the polypeptide shown in SEQ ID NO: 22.

[0046] SEQ ID NOS: 22, 23 AND 24, denote, respectively, clones 1A9, 1B2 and 4A4, each comprising a partial sequence with no associated polypeptide.

145

[0047] It has now been discovered that certain of the protective antigens exhibit activity and are expressed across tick species, and in some circumstances across genera, thus making possible the use of these common antigens in broad range anti-tick vaccine formulations.

**Example 3: Extension of *I. scapularis* Protective Antigens
To Other Tick Species**

Methods

RNA extraction and reverse transcription (RT)-PCR

[0048] Total RNA was extracted from guts and salivary glands dissected from 30 unfed *I. scapularis* females, approximately 100 and 1000 *I. scapularis* nymphs and larvae, respectively, the egg mass oviposited by one *I. scapularis* female, salivary glands dissected from 10 *D. variabilis* males, salivary glands and guts dissected from 20 *A. americanum* and *R. sanguineus* adults, 10 *B. microplus* adults and 10 *I. pacificus* females, respectively and 100-150 *I. ricinus* larvae. Total RNA was extracted from homogenized tick samples using TRI Reagent (Sigma), except for *I. ricinus* and *B. microplus* RNA which were extracted using the RNA Instapur kit (Eurogentec, Seraing, Belgium) and the RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), respectively, according to the manufacturer's instructions. The final RNA pellet was resuspended in 50-100 μ l diethyl pyrocarbonate-treated distilled deionized sterile water. RT-PCR reactions were performed using the Access RT-PCR system (Promega, Madison, WI, USA). One μ l RNA was reverse transcribed in a 50 μ l reaction mixture (1.5 mM $MgSO_4$, 1 X avian myeloblastosis virus (AMV) RT/*Thermus flavus* (Tfl) reaction buffer, 10 mM random hexamer, 0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 5 U AMV RT, 5u Tfl DNA polymerase (Promega), 10 pmol of each primer) at 48°C for 45 min. After 2 min

24 146

incubation at 94°C, PCR was performed in the same reaction mixture with specific primers and amplification conditions (Table 5). Control reactions were performed using the same procedures but without RT to control for DNA contamination in the RNA preparations and without RNA added to control contamination of the PCR reaction. Positive control reactions for the PCR were performed with plasmid DNA containing the cloned tick cDNAs and with genomic DNA extracted from *I. scapularis* IDE8 cells. PCR products were electrophoresed on 1% agarose gels to check the size of amplified fragments by comparison to a DNA molecular weight marker (1 Kb Plus DNA Ladder, Promega).

Cloning and sequencing of D. variabilis, A. americanum and B. microplus 4D8

[0049] Fragments of the *D. variabilis*, *A. americanum* and *B. microplus* 4D8 cDNA were amplified by RT-PCR and cloned into pGEM-T (Promega). Four clones of each were sequenced at the Core Sequencing Facility, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Noble Research Center, Oklahoma State University.

Vaccination of rabbits and challenge with I. scapularis, D. variabilis and A. americanum nymphs

[0050] An experiment was designed to evaluate the effect of tick protective antigens on nymphal stages of *I. scapularis*, *D. variabilis* and *A. americanum*. One New Zealand White rabbit per group was each immunized with 3 doses (weeks 0, 4 and 7) containing 50 µg/dose purified 4F8 and 4D8 proteins or 4E6 synthetic peptide derived from *I. scapularis*, a combination of 4F8+4D8+4E6 or bovine serum albumin (Sigma) as control in FIA (Sigma). Animals were cared for in accordance with standards specified in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Rabbits were injected subcutaneously

147

with 500 μ l/dose using a 1 ml tuberculin syringe and a 27½G needle. Two weeks after the last immunization, rabbits were infested with 100 *I. scapularis* nymphs per rabbit in one ear and 110 nymphs of each *D. variabilis* and *A. americanum* on the other ear. The number of nymphs attached was recorded and engorged nymphs dropping from each rabbit's ear were collected daily and counted during 7 days. *D. variabilis* and *A. americanum* engorged nymphs were separated under a dissecting light microscope. Engorged nymphs collected after completion of the feeding period were counted and weighted. The inhibition of tick nymphal infestation was calculated with respect to the control group as described previously for larval tick infestations (Almazán et al., 2003). The reduction on the weight of engorged nymphs was determined in experimental groups with respect to the nymphs collected from the control group.

Results

Expression of protective cDNAs

[0051] Expression of genes encoding for tick protective antigens was analyzed at mRNA and protein levels by RT-PCR and immunohistochemistry, respectively. Expression of 4F8, 4D8 and 4E6 mRNA was detected in all *I. scapularis* developmental stages and in guts and salivary glands from adult ticks (Table 6). Control reactions ruled out contamination with genomic DNA or during the PCR. Furthermore, PCR of tick genomic DNA showed that the size of the amplified DNA fragments was higher than the size corresponding to cDNA fragments, probably due to the presence of intron sequences in the analyzed genes (Table 6).

[0052] Sequence conservation and expression of 4F8, 4D8 and 4E6 were analyzed in *I. scapularis* related species, *I. pacificus* and *I. ricinus*, and in *D. variabilis*,

108

R. sanguineus, *B. microplus* and *A. americanum* by RT-PCR (Table 6) using the primers derived from *I. scapularis* sequences (Table 5). Expression was detected in *I. ricinus* for all three genes and in *I. pacificus* for 4D8 and 4E6. Expression of 4D8 was also detected in *D. variabilis*, *B. microplus*, *R. sanguineus* and *A. americanum*.

Sequence of D. variabilis, A. americanum and B. microplus 4D8

[0053] The sequences of *D. variabilis*, *A. americanum* and *B. microplus* 4D8 cDNAs and their deduced amino acid sequences are provided in SEQ ID NOS: 26-31. The sequences associated with tick protective antigen 4D8 derived from *Rhipicephalus appendiculatus* are provide in SEQ ID NOS: 38-39.

Protective properties of tick antigens against I. scapularis, D. variabilis and A. americanum nymphal infestations

[0054] The detection of 4D8 and 4E6 expression in non-*Ixodes* tick species were the basis for an experiment in which rabbits were immunized with *I. scapularis* derived protective antigens and challenged with *I. scapularis*, *D. variabilis* and *A. americanum* larvae. The results suggested an effect of 4D8 immunization on the inhibition of nymphal infestations in all three tick species and a notable effect on *D. variabilis* nymphs reflected in the number of visibly damaged ticks and the reduction in the weight of engorged nymphs (Table 7). Immunization with 4F8 had an effect on *I. scapularis* nymphal infestations only and the effect of 4E6 immunization was reflected on *A. americanum* infestations and on the weight of *D. variabilis* engorged nymphs (Table 7). The synergistic effect of the immunization with all three antigens was observed for 4D8 in *I. scapularis* nymphs (Table 7).

37 149

[0055] Experiment 3, then, demonstrates the surprising utility of using *I. scapularis* tick protective antigens 4D8, 4F8 and 4E6 in vaccine formulations for the control of multiple tick species.

[0056] Thus, the present invention relates to the identification of these antigens which are protective against a broad range of tick species, gene sequences and encoded proteins for such antigens, related vaccines and methods useful to induce an immune response. More generally, the invention concerns the given cDNA sequences and any nucleotide sequence coding for a protein which is capable of eliciting an antibody or other immune response (e.g., T-cell response of the immune system) which recognizes an epitope(s) of the amino acid sequences depicted in the Sequence Listing, including less than the full cDNA sequences and mutants thereof. Hence the nucleotide sequence may encode a protein which is the entire antigen encoded by the variously identified bases, or a fragment or derivative of the antigen or a fusion product of the antigen or fragment and another protein, provided that the protein which is produced from such sequence is capable of eliciting an antibody or other immune response which recognizes an epitope(s) of the given amino acid sequences.

[0057] As a result, the invention encompasses DNA sequences which encode for and/or express in appropriate transformed cells, proteins which may be the full length antigen, antigen fragment, antigen derivative or a fusion product of such antigen, antigen fragment or antigen derivative with another protein.

[0058] As will be appreciated by those of ordinary skill in the art, a nucleotide sequence encoding the inventive antigens or variants thereof may differ from the native sequences presented herein due to codon degeneracies, nucleotide polymorphisms, or

32 150

nucleotide substitutions, deletions or insertions. While several embodiments of such molecules are depicted in the Sequence Listing, it should be understood that within the context of the present invention, reference to one or more of these molecules includes variants that are naturally occurring and/or synthetic sequences which are substantially similar to the sequences provided herein and, where appropriate, the protein (including peptides and polypeptides) that are encoded by these sequences and their variants. As used herein, the nucleotide sequence is deemed to be "substantially similar" if: (a) the nucleotide sequence is derived from the coding region of a native gene of the various noted tick species and encodes a peptide or polypeptide possessing the described antigenicity (including, for example, portions of the sequence or allelic variations of the provided sequences); or (b) the nucleotide sequences are degenerate (i.e., sequences which encode the same amino acid using a different codon sequence) as a result of the genetic code to the nucleotide sequences defined in (a); or (c) the nucleotide sequence is at least 95% identical to a nucleotide sequence provide herein, or (d) is a complement of any of the sequences described in (a-c).

[0059] Proteins included within the present invention have an amino acid sequence depicted in the Sequence Listing and homologs thereof. Other included proteins consist of a fragment of said sequence capable of eliciting an antibody or other immune response which recognizes an epitope(s) of the amino acid sequences depicted and a mutant of said sequence capable of eliciting an antibody or other immune response which recognizes an epitope(s) of such amino acid sequences. With respect to homology to the native sequence, a variant should preferably have at least 95% amino acid sequence homology. As used herein, amino acid "homology" is determined by a computer

St 131

algorithm incorporated in a protein database search program commonly used in the art, for example, as incorporated in the programs BLAST (BLAST.TM., a computer program) (Altschul et al., Nucleic Acids Res. (25) 3389-3402, 1997) or DNA STAR MEGALIGN (DNA STAR MEGALIGN.TM., a computer program) which return similar results in homology calculations.

[0060] The nucleotide sequences may be inserted into any of a wide variety of expression vectors by a variety of procedures. Such procedures and others are deemed to be known by those skilled in the art. Suitable vectors include chromosomal, nonchromosomal and synthetic DNA sequences; e.g., derivatives of SV40; bacterial plasmids; phage DNAs; yeast plasmids; vectors derived from combinations of plasmids and phage DNAs, viral DNA such as baculovirus, vaccinia, adenovirus, fowl pox virus, pseudorabies, etc. The appropriate DNA sequence must be operatively linked in the vector to an appropriate expression control sequence(s) (promoter) to direct mRNA synthesis. As representative examples of such promoters, there may be mentioned LTR or SV40 promoter, the *E. coli* lac or trp, the phage lambda PL promoter and other promoters known to control expression of genes in prokaryotic and eukaryotic cells or their viruses. The expression vector also includes a non-coding sequence for a ribosome binding site for translation initiation and a transcription terminator. The vector may also include appropriate sequences for amplifying expression.

[0061] The vector containing the appropriate cDNA sequence as hereinabove described, as well as an appropriate promoter or control sequence, may be employed to transform an appropriate host to permit the host to express the protein. Examples of host organisms and cells include bacterial strains (e.g., *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*,

152

Salmonella, etc.), fungi (e.g., yeasts and other fungi), animal or plant hosts (e.g., mouse, swine or animal and human tissue cells). The selection of the host is deemed to be within the scope of those skilled in the art.

[0062] It is also understood that the appropriate cDNA sequence present in the vector when introduced into a host may express part or only a portion of the protein which is encoded within the noted terminology, it being sufficient that the expressed protein be capable of eliciting an antibody or other immune response which recognizes an epitope(s) of the listed amino acid sequences.

[0063] The isolated cDNAs and/or polypeptide expressed by the host transformed by the vector may be harvested by methods which will occur to those skilled in the art and used in a vaccine for protection of a mammal, such as dogs, cattle, humans, etc., against infestations of *Ixodes* and non-*Ixodes* tick species. Such protective recombinant proteins and/or modified cDNAs are used in an amount effective to induce an immune response against such ticks and their associated pathogens and may be used in combination with a suitable physiologically acceptable carrier. The term "inducing an immune response" when used with respect to the vaccine described herein means that the vaccine prevents disease associated with a particular tick species or reduces the severity of the disease.

[0064] The carrier employed in conjunction with vaccine may be any one of a wide variety of carriers. As representative examples of suitable carriers, there may be mentioned mineral oil, synthetic polymers, etc. Carriers for vaccines are well known in the art and the selection of a suitable carrier is deemed to be within the scope of those

153

skilled in the art. The selection of a suitable carrier is also dependent upon the manner in which the vaccine is to be administered.

[0065] The present invention provides a method of immunizing a susceptible mammal, against infestations and disease caused by ticks with the vaccine described above. For purposes of this invention, the vaccine is administered in an effective amount. The vaccine may be administered by any of the methods well known to those skilled in the art, for example, by intramuscular, subcutaneous, intraperitoneal or intravenous injection. Alternatively, the vaccine may be administered intranasally or orally. It is also to be understood that the vaccine may include active components, such as tick-borne pathogen components or adjuvants in addition to the antigen(s) or fragments hereinabove described.

[0066] The host expressing the antigen may itself be used to deliver antigen to non-human animals, by introducing killed or viable host cells that are capable of propagating in the animal. Direct incorporation of the cDNA sequences into host cells may also be used to introduce the sequences into animal cells for expression of antigen in vivo.

02/154

Bibliography

The following references are incorporated herein by reference:

- Alberti E, Acosta A, Sarmiento ME, Hidalgo C, Vidal T, Fachado A, Fonte L, Izquierdo L, Infante JF, Finlay CM, Sierra G. Specific cellular and humoral immune response in Balb/c mice immunised with an expression genomic library of *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine* 1998; 16: 608-12.
- Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, de la Fuente J. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine* 21, 1492-1501 (2003).
- Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, de la Fuente J. Characterization of genes transcribed in an *Ixodes scapularis* cell line that were identified by expression library immunization and analysis of expressed sequence tags. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 7:9-25 (2000).
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-10.
- Barry MA, Lai WC, Johnston SA. Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature* 1995; 377: 632-5.
- Black WC 4th, Piesman J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10034-8.

✓ 155

Brayton KA, Vogel SW, Allsopp BA. Expression library immunization to identify protective antigens from *Cowdria ruminantium*. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 849: 369-71.

Cassataro J, Velikovsky CA, Giambartolomei GH, Estein S, Bruno L, Cloeckaert A, Bowden RA, Spitz M, Fossati CA. Immunogenicity of the *Brucella melitensis* recombinant ribosome recycling factor-homologous protein and its cDNA. *Vaccine* 2002; 20: 1660-9.

de la Fuente J, Kocan KM. 2003. Advances in the identification and characterization of protective antigens for development of recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Review of Vaccines*. 2:583-593.

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, Artiles M, Garcia L. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac against the cattle tick *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. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genet Anal* 1999; 15: 143-8.

de la Fuente J, Rodriguez M, Garcia-Garcia JC. Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 916: 617-21.

cat 156

- De Rose R, McKenna RV, Cobon G, Tennent J, Zakrzewski H, Gale K, Wood PR, Scheerlinck JP, Willadsen P. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 71: 151-60.
- de Vos S, Zeinstra L, Taoufik O, Willadsen P, Jongejan F. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Exp Appl Acarol* 2001; 25: 245-61.
- Drew DR, Lightowlers M, Strugnell RA. Vaccination with plasmid DNA expressing antigen from genomic or cDNA gene forms induces equivalent humoral immune responses. *Vaccine* 1999; 18: 692-702.
- Elad D, Segal E. Immunogenicity in calves of a crude ribosomal fraction of *Trichophyton verrucosum*: a field trial. *Vaccine* 1995; 13: 83-7.
- Estrada-Peña A, Jongejan F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *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. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol* 1999; 23: 883-95.
- Kofta W, Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Vet Parasitol* 2001; 100: 3-12.

✓
157

Liyou N, Hamilton S, Elvin C, Willadsen P. Cloning and expression of ecto 5'-nucleotidase from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Insect Mol Biol* 1999; 8: 257-66.

Liyou N, Hamilton S, McKenna R, Elvin C, Willadsen P. Localization and functional studies on the 5'-nucleotidase of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Appl Acarol* 2000; 24: 235-46.

Manoutcharian K, Terrazas LI, Gevorkian G, Govezensky T. Protection against murine cysticercosis using cDNA expression library immunization. *Immunol Lett* 1998; 62: 131-6.

Melby PC, Ogden GB, Flores HA, Zhao W, Geldmacher C, Biediger NM, Ahuja SK, Uranga J, Melendez M. Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. *Infect Immun* 2000; 68: 5595-602.

Moore RJ, Lenghaus C, Sheedy SA, Doran TJ. Improved vectors for expression library immunization--application to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Vaccine* 2001; 20: 115-20.

Mulenga A, Sugimoto C, Onuma M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes Infect* 2000; 2: 1353-61.

Munderloh UG, Wang YLM, Chen C, Kurti TJ. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J Parasitol* 1994; 80: 533-43.

- Nuttall PA. Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. Zentralbl Bakteriol 1999; 289: 492-505.
- Parola P, Raoult D. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 80-3.
- Silva CL. The potential use of heat-shock proteins to vaccinate against mycobacterial infections. Microbes and Infection 1999; 1: 429-35.
- Singh RA, Wu L, Barry MA. Generation of genome-wide CD8 T cell responses in HLA-A*0201 transgenic mice by an HIV-1 ubiquitin expression library immunization vaccine. J Immunol 2002; 168: 379-91.
- Smooker PM, Setiady YY, Rainczuk A, Spithill TW. Expression library immunization protects mice against a challenge with virulent rodent malaria. Vaccine 2000; 18: 2533-40.
- van Drunen Littel-van den Hurk S, Loehr BI, Babiuk LA. Immunization of livestock with DNA vaccines: current studies and future prospects. Vaccine 2001; 19: 2474-9.
- Wikel SK, Ramachandra RN, Bergman DK, Burkot TR, Picman J. Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. Infect Immun 1997; 65: 335-8.
- Willadsen P. Novel vaccines for ectoparasites. Vet Parasitol 1997; 71: 209-22.
- Willadsen P, Jongejan F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. Parasitol Today 1999; 15: 258-62.

67/139

Table 1. Primary screen of the *I. scapularis* cDNA library by ELI in mice.

Experimental group ^a	Number of pools screened (Number of clones)	Average±SD number of larvae attached per mouse ^b	Average±SD number of engorged larvae per mouse ^c	Average±SD inhibition of tick infestation (I) ^d	Number of pools selected for the secondary screen
Experiment 1	33 (1383)	50±13 (33-80)	9±3 (2-42)	39±55% (-183 - 87%)	6 (I>75%)
Vector DNA-immunized controls for experiment 1	—	56±13 (45-67)	16±4 (5-27)	—	—
Experiment 2	33 (1322)	56±15 (29-79)	13±4 (1-27)	27±28% (-53 - 89%)	3 (I>60%)
Vector DNA-immunized controls for experiment 2	—	54±18 (36-73)	17±3 (6-28)	—	—

^aNinety six LBA plates containing an average of 41 cDNA clones per plate were prepared. Replicas were made and clones from each plate were pooled, inoculated, grown for 2 hr in a 96 wells plate and plasmid DNA purified from each pool for ELI. Three mice per group were each immunized IM twice with 1 µg DNA/dose in 50 µl PBS two weeks apart. Two groups of 3 mice each were included as controls. One group was injected with vector DNA and the second with saline only.

^bFifteen days after the last immunization, mice were infested with 100 *I. scapularis* larvae per mouse. Twelve hrs later, larvae that did not attach were counted to calculate the number of attached larvae per mouse and mice were transferred to new cages.

^cEngorged larvae dropping from each mouse were collected daily and counted after 7 days.

^dThe inhibition of tick infestation (I) for each test group was calculated with respect to vector-immunized controls as $[1-(RL_n/RL_c \times RL_i/RL_{in})] \times 100$, where RL_n is the average number of replete larvae recovered per mouse for each test group, RL_c is the average number of replete larvae recovered per mouse for control group, RL_i is the average number of larvae attached per mouse for control group, and RL_{in} is the average number of larvae attached per mouse for each test group.

160

Table 2. Classification of the clones in protective pools by putative protein function according to identity to sequence databases.

Putative protein Function	Number of clones
Biosynthetic ^a	2
Catabolism	4
Cell adhesion	2
Cell cycle ^a	2
Cytoskeletal ^a	8
Defense	2
DNA structure or replication ^a	3
Extracellular matrix	3
Endocytosis	2
Energy metabolism	10
Homeostasis	2
Morphogenetic	9
Mitochondrial ^a	34
Protein synthesis or processing ^{a,b}	34
RNA synthesis or processing ^a	7
Heat-shock proteins	4
Signal transduction	16
Transport	8
Unknown	199
Total	351

^aEliminated from further screening of protective antigens. Other clones were eliminated for containing similar sequences.

^bExcept for ribosomal proteins.

64 161

Table 3. Grouping of the clones according to the predicted function of encoded proteins in sub-pools for the tertiary screen.

Sub-pool (No. of clones)	Clone	Pool^a
Ribosomal (17)	1A2, 1A10, 1C11 1F6 2B8 2F8, 2F10 3A10, 2C3, 3D2, 3D10 3G9, 3G10 4D11, 4D12, 4E7, 4F7	A5 D1 A10 E8 B4 E3 F1
Membrane protein (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
Cell channel/Transporter (5)	1F4 2H11 4A12 4G10, 4G11	D1 E8 C3 F1
Early development-specific (4)	1C8 3F4 4C7 4G9	A5 E3 C3 F1
G protein-coupled receptor (4)	2B7, 2C12 2F12 4C9	A10 E8 C3
Growth factor receptor (3)	2E8 3B8, 3C8	B5 B4
Lectin (3)	3E10 4B8, 4C8	E3 C3
Vitellogenin (3)	1F12 4A6 4Q2	D1 C3 F1
Heat shock (3)	1C10 1F10 3F6	A5 D1 E3
EGF-like (2)	2H4 4C10	E8 C3
Secreted protein (2)	2F9 3C12	E8 B4
Glutamine-Alanine rich (2)	4D6, 4E6	F1
Adaptin (1)	3E1	E3
Endopeptidase (1)	4D8	F1
Nucleotidase (1)	4F8	F1

^acDNA pools refer to positive pools after primary and secondary screens (Fig. 2A and 2B).

Table 4: Summary of results with *I. scapularis* cDNA clones.

cDNA clone	Predicted Protein	Inhibition of tick infestation I (%)	Inhibition of molting M (%)	Efficacy E (%)
4D8	Endopeptidase	40*/54**	7*/8**	44*/58**
4F8	Nucleotidase	50*/64**	17*/9**	58*/61**
1C10	HSP70	17*	ND	ND
4D6	Glu-Ala-rich	61*	11	66*
4E6	Glu-Ala-rich	20*/46**	16**	55**
3E1	β -adaptin (appendage region)	27*	5*	31*
2C12	Beta-amyloid precursor protein (APP)	-8***	ND	ND
4F11	Block of proliferation Bop1	-39***	ND	ND
3E10	Mannose binding lectin	-48*/-10***	ND	ND
4G11	Chloride channel	38***	30	57
3C12	RNA polymerase III	-104***	ND	ND
1A9, 1B2, 4A4	ATPase	-57***	ND	ND

Mice were immunized with cDNA-containing expression plasmid DNA as described above (*) or with 100 μ g/dose of recombinant protein expressed in *E. coli* (**). I, M and E were calculated as described above. ND, not determined.

***Resulted in a pro-feeding activity. This effect could be due to the expression of cDNAs encoding for tick immunosuppressants, anticoagulants and other proteins with low antigenicity and a pro-feeding activity. Alternatively, they could encode for proteins homologous to host proteins with anti-tick activity, which neutralization results in a tick pro-feeding activity.

✓ 163

Table 5. RT-PCR conditions for the characterization of expression profiles of tick protective cDNAs.

cDNA	RT-PCR primers (5'-3')	PCR conditions ^a	Size of cDNA band ^b	Size of DNA band ^c
4F8	4F8R5: GCGTCGTGTGGAGCATCAGCGAC (SEQ ID NO: 32) 4F8-R: TCGCAACGGACAACGGCAGGTTG (SEQ ID NO: 33)	94°C, 30 sec 61°C, 30 sec 68°C, 2 min	972 bp	>1,600 bp
4D8	4D8R5: GCTTGCGCAACATTAAAGCGAAC (SEQ ID NO: 34) 4D8-R: TGCTTGTTTGCAGATGCCCATCA (SEQ ID NO: 35)	94°C, 30 sec 56°C, 30 sec 68°C, 1 min	577 bp	>1,600 bp
4E6	4E6R5: GAAATATCTGTGAAACCAAGGCC (SEQ ID NO: 36) 4E6U-R: ATTGCAACACATCATTAACTG (SEQ ID NO: 37)	94°C, 30 sec 52°C, 30 sec 68°C, 1 min	138 bp	~1,600 bp

^aPCR conditions are indicated for denaturing, annealing and polymerization steps, respectively.

^bCalculated from the sequence of the cDNA insert.

^cEstimated from the PCR of IDES genomic DNA.

Table 6. Expression profile of mRNAs encoding for protective antigens in ticks.

RNA source	<i>I. scapularis</i>						<i>I. pacificus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>A. americanum</i>	<i>D. variabilis</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>R. microplus</i>
	IDES	es	sv	na	ph	sa						
Clone	mRNA expression											
4F8	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
4D8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4E6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Expression of mRNAs encoding for tick protective antigens 4F8, 4D8 and 4E6 was analyzed by RT-PCR in different tick species using the primers derived from *I. scapularis* sequences.

164

Table 7. Results of vaccination with recombinant tick protective antigens on *I. scapularis*, *D. variabilis* and *A. americanum* nymphs.

Tick species	Inhibition of tick nymphal infestation (%) ^a				Reduction in the weight of engorged nymphs (%) ^b			
	4D8	4F8	4E6	All	4D8	4F8	4E6	All
<i>I. scapularis</i>	35	39	0	63	0	0	0	0
<i>D. variabilis</i>	22	0	5	8	32	0	27	0
<i>A. americanum</i>	17	9	36	12	3	1	0	16

^aDetermined with respect to the number of engorged nymphs recovered from the control group as described above for tick larval infestations.

^bAverage weight per engorged nymph with respect to the weight of nymphs collected from the control group.

75 165

[0067] In view of the above, it will be seen that the several objectives of the invention are achieved and other advantageous results attained. As various changes could be made in the above DNA molecules, proteins, etc. without departing from the scope of the invention, it is intended that all matter contained in the above description or shown in the accompanying drawings shall be interpreted as illustrative and not in a limiting sense. While the invention has been described with a certain degree of particularity, it is understood that the invention is not limited to the embodiment(s) set for herein for purposes of exemplification, but is to be limited only by the scope of the attached claim or claims, including the full range of equivalency to which each element thereof is entitled.

7/16/66

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated polypeptide selected from the group consisting of tick derived polypeptides designated 4D8, 4F8 and 4E6.
2. A multi species anti-tick vaccine composition comprising the polypeptide of claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.
3. The isolated polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the tick derived polypeptide 4D8.
4. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of at least one of SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO: 31, or SEQ ID NO:39.
5. A multi species anti-tick vaccine composition comprising the polypeptide of claim 4 and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.
6. The polypeptide of claim 4, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:4.
7. The polypeptide of claim 4, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:27.
8. The polypeptide of claim 4, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:29.
9. The polypeptide of claim 4, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:31.
10. The polypeptide of claim 4, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:39.

2/168

21. A multi species anti-tick vaccine comprising an effective immunizing amount of an immunogen selected from the group consisting of (i) the isolated cDNA molecule of claim 18, (ii) the polypeptide encoded by the isolated cDNA molecule of claim 18, and (iii) a combination of the isolated cDNA molecule of claim 18 and the encoded polypeptide, and further comprising a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

22. A method of inducing an immune response in a mammal against multi species tick infestation and their associated pathogens, comprising administering to the mammal the vaccine of claim 21.

23. The polypeptide encoded by the isolated cDNA molecule of claim 18.

24. An isolated cDNA molecule which encodes a tick derived antigenic polypeptide, said molecule having a nucleotide sequence that is at least 95% homologous to at least residues 10-951 of SEQ ID NO: 5.

25. An expression vector comprising the isolated cDNA molecule of claim 24.

26. An isolated cell transformed by the expression vector of claim 25.

27. A multi species anti-tick vaccine comprising an effective immunizing amount of an immunogen selected from the group consisting of (i) the isolated cDNA molecule of claim 24, (ii) the polypeptide encoded by the isolated cDNA molecule of claim 24, and (iii) a combination of the isolated cDNA molecule of claim 24 and the encoded polypeptide, and further comprising a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

169

28. A method of inducing an immune response in a mammal against multi species tick infestation and their associated pathogens, comprising administering to the mammal the vaccine of claim 27.

29. The polypeptide encoded by the isolated cDNA molecule of claim 24.

30. An isolated cDNA molecule which encodes a tick derived antigenic polypeptide, said molecule having a nucleotide sequence that is at least 95% homologous to SEQ ID NO: 26.

31. An expression vector comprising the isolated cDNA molecule of claim 30.

32. An isolated cell transformed by the expression vector of claim 31.

33. A multi species anti-tick vaccine comprising an effective immunizing amount of an immunogen selected from the group consisting of (i) the isolated cDNA molecule of claim 30, (ii) the polypeptide encoded by the isolated cDNA molecule of claim 30, and (iii) a combination of the isolated cDNA molecule of claim 30 and the encoded polypeptide, and further comprising a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

34. A method of inducing an immune response in a mammal against multi species tick infestation and their associated pathogens, comprising administering to the mammal the vaccine of claim 33.

35. The polypeptide encoded by the isolated cDNA molecule of claim 30.

36. An isolated cDNA molecule which encodes a tick derived antigenic polypeptide, said molecule having a nucleotide sequence that is at least 95% homologous to SEQ ID NO: 28.

37. An expression vector comprising the isolated cDNA molecule of claim 36.

26 170

38. An isolated cell transformed by the expression vector of claim 37.

39. A multi species anti-tick vaccine comprising an effective immunizing amount of an immunogen selected from the group consisting of (i) the isolated cDNA molecule of claim 36, (ii) the polypeptide encoded by the isolated cDNA molecule of claim 36, and (iii) a combination of the isolated cDNA molecule of claim 36 and the encoded polypeptide, and further comprising a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

40. A method of inducing an immune response in a mammal against multi species tick infestation and their associated pathogens, comprising administering to the mammal the vaccine of claim 39.

41. The polypeptide encoded by the isolated cDNA molecule of claim 36.

42. An isolated cDNA molecule which encodes a tick derived antigenic polypeptide, said molecule having a nucleotide sequence that is at least 95% homologous to SEQ ID NO: 30.

43. An expression vector comprising the isolated cDNA molecule of claim 42.

44. An isolated cell transformed by the expression vector of claim 43.

45. A multi species anti-tick vaccine comprising an effective immunizing amount of an immunogen selected from the group consisting of (i) the isolated cDNA molecule of claim 42, (ii) the polypeptide encoded by the isolated cDNA molecule of claim 42, and (iii) a combination of the isolated cDNA molecule of claim 42 and the encoded polypeptide, and further comprising a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

24 171

46. A method of inducing an immune response in a mammal against multi species tick infestation and their associated pathogens, comprising administering to the mammal the vaccine of claim 45.

47. The polypeptide encoded by the isolated cDNA molecule of claim 42.

48. An isolated cDNA molecule which encodes a tick derived antigenic polypeptide, said molecule having a nucleotide sequence that is at least 95% homologous to SEQ ID NO: 38.

49. An expression vector comprising the isolated cDNA molecule of claim 48.

50. An isolated cell transformed by the expression vector of claim 49.

51. A multi species anti-tick vaccine comprising an effective immunizing amount of an immunogen selected from the group consisting of (i) the isolated cDNA molecule of claim 48, (ii) the polypeptide encoded by the isolated cDNA molecule of claim 48, and (iii) a combination of the isolated cDNA molecule of claim 48 and the encoded polypeptide, and further comprising a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

52. A method of inducing an immune response in a mammal against multi species tick infestation and their associated pathogens, comprising administering to the mammal the vaccine of claim 51.

53. The polypeptide encoded by the isolated cDNA molecule of claim 48.

P. 122

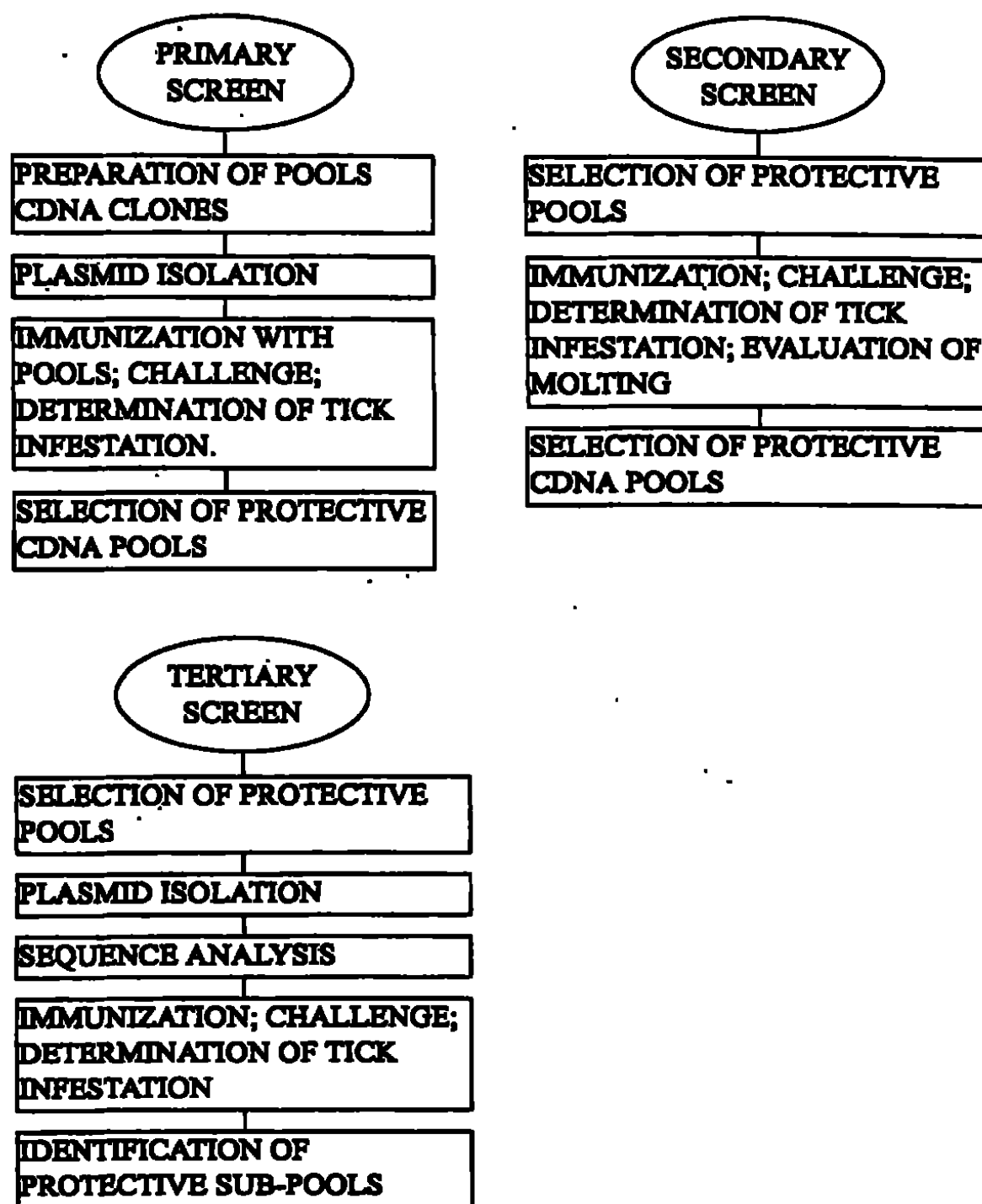
ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

Broad range protective antigens against tick infestations, gene sequences and encoded proteins for such antigens, related vaccines and methods useful to induce an immune response.

W 8284053 v1

8f H3

FIG. 1



62
17A

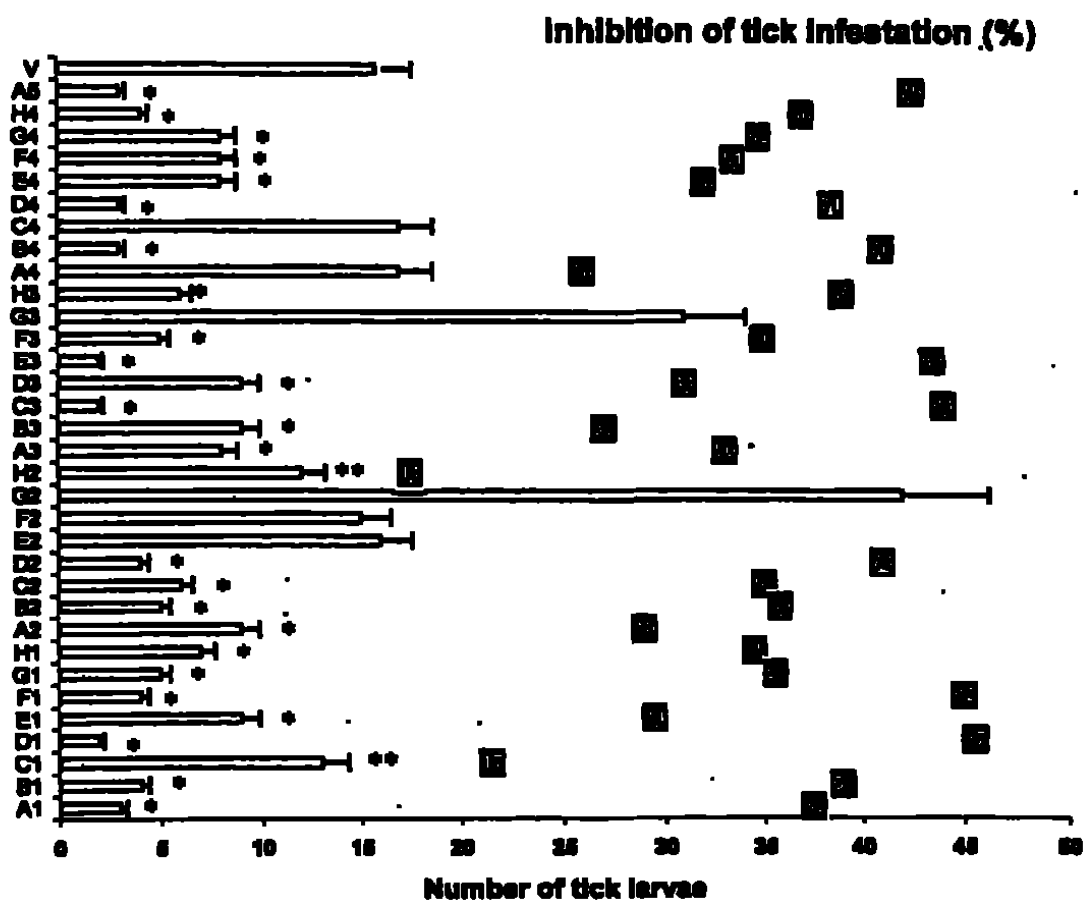


FIG. 2A

83/125

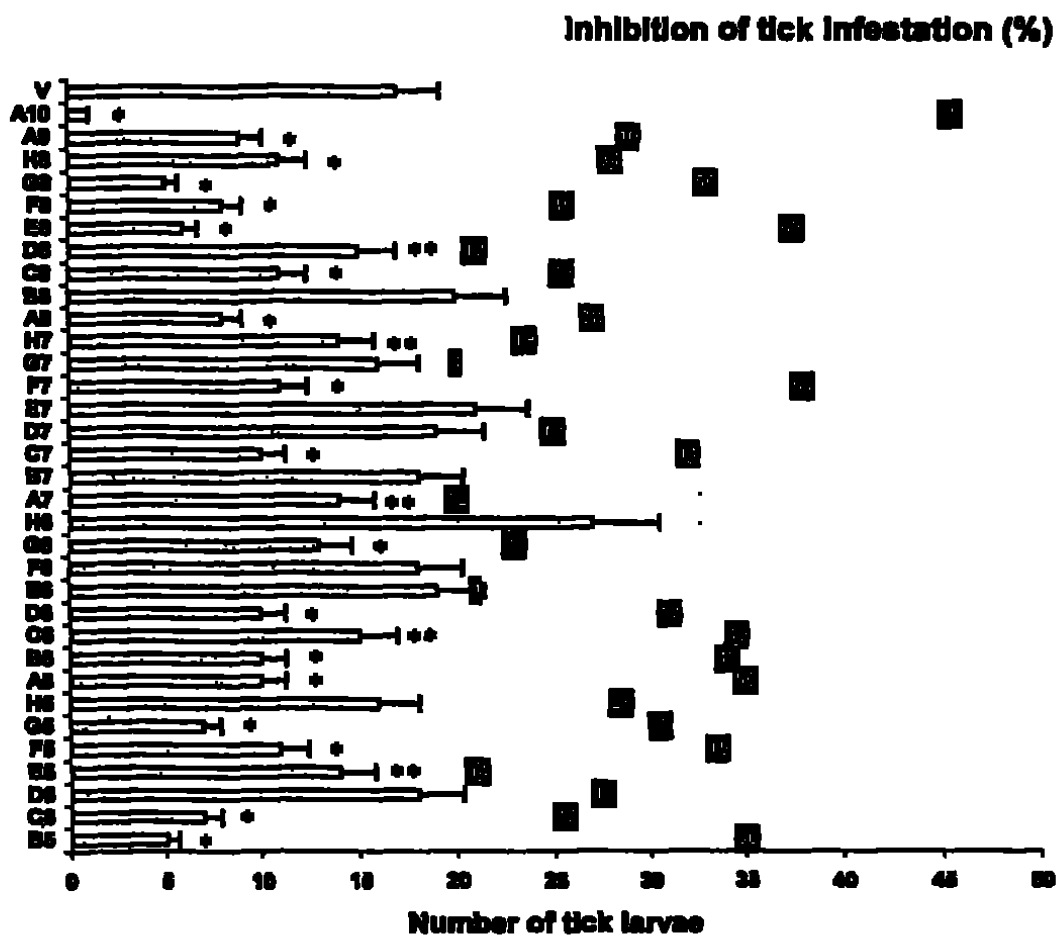


FIG. 2B

2/12/06

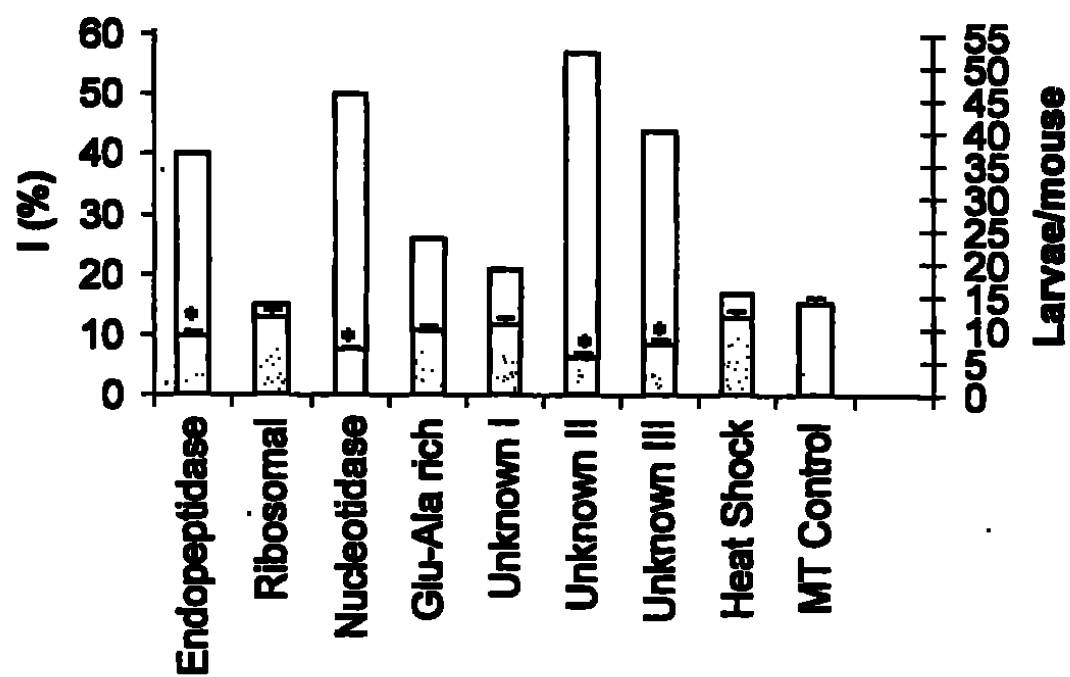


FIG. 3

8/177

FuenteCIP.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> De La Fuente, Jose de Jesus
Kocan, Katherine M.
Garcia-Almazan, Consuelo
Blouin, Edwin F.

<120> Protective Antigens and Vaccines for the Control of Multi Species
Tick Infestations

<130> 04-597

<150> 10/425,563
<151> 2003-04-29

<150> 60/376,251
<151> 2002-04-29

<160> 37

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 349
<212> DNA
<213> Ixodes scapularis

<400> 1
atggaaatat ctgtgaaacc aaggccacaca aaaaggaaaa gaaaggccat catcatcatg 60
gcaagaatga gaacagcatt ccccaccaga agtgggaaca gcttctcaag gacttgaaca 120
gttaatgatg tgttggtgcaa ttcgaatgtg gctgcaacct cgctagagaa catagtcgac 180
cagctgtagt gctctagtat taaccaagaa gcagtattct gccgtcatat gtacaggcag 240
atttgttacg gcatttttcag ctttttttta tacaaaatgt agttcttggt taaaaaaaac 300
ctaaaataaa acaaagccac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 349

<210> 2
<211> 38
<212> PKT
<213> Ixodes scapularis

<400> 2
Met Glu Ile Ser Val Lys Pro Arg Pro Thr Lys Arg Lys Arg Lys Ala
1 5 10 15
Ile Ile Ile Met Ala Arg Met Arg Thr Ala Phe Pro Thr Arg Ser Gly
20 25 30
Asn Ser Phe Ser Arg Thr
35

<210> 3
<211> 2693
<212> DNA

fb 178

FuenteCIP.ST25

<213> Ixodes scapularis

<220>
<221> misc_feature
<222> (685)..(685)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (1962)..(1962)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 3
ggtttgtgct gcttggaataa tccaccagga gcctgcaacc gcaaaaaagt tcatcatccg 60
gagctaagcc tatcgagga tggcttgccg aacattaaag cgaacacacg attgggatcc 120
gctgcatagt ccaaacggaa gatcgcccaa acgacggaga tgtatgcctt tgcgggtcac 180
acaagcagcg actcccccaa caagggcaca ccaaatcaac ccttcaccct tcggtgaagt 240
gccaccgaaa ttaacttcag aggagatagc ggccaacatt cgggaggaaa tgcgacgtct 300
gcagcggcgc aagcagctct gcttctcgtc tcccctggag tcgggctccc cgtcggcgac 360
tcccctgcg gccgattgcg gaccagctc cccacgggc ctgtcccccg ggggcctgct 420
gtcgcccggt cgaggggacc aaccctctt caccttcgc caggtggggc tcatctgcga 480
gcgcatgatg aaggagcgc agagccagat acgcgacgag tacgaccacg ttctgtctgc 540
caagctggca gagcagtacg acacatttgt caagtttacg tacgaccaa ttcagaagcg 600
gtttgagggg gccactccaa gctatttgc ataacatgat gggcatctgc aaacaagcaa 660
ggaactttga gggtttgtgc taganggaag aaacctatgg tggggaagga cacaagacca 720
acacttagac tcggcaagca agccagatcc tgtgggggtgc ggggacgggg ggaatgagtc 780
cagtgggtgc ttcggagttt tttttttcc ttctccctt cctcgtctt ctttttgga 840
caactcttta cggaactggt gtgcatccat tccccgaaag tgcaagagaa ggactcgcgg 900
cggatcatct acggaggaag aagtgtgtat gcctttgtgc tttgggtctc ctttttttt 960
tttttaaccg tcttgccatc tcgcataga agacctgtga tctagcaaac aaaggtgtgc 1020
gaatgttatg caaagggttg aagtcagttt gaaagtgag cgagagaaaa tttgtatgc 1080
tgagtatggt tagtcaccgt ttacttttca ggagggggat gactgaggaa cggagccgcc 1140
ccaactctcg tttgtctttt attttttagga tactttctct gtggcgagaa tttgtgtgtg 1200
catgcaagtt agcgagggtg cgaggaaaag aagggttata aaatattctg ggtgagagct 1260
gtagttcaac tgggggggtg gattgtaaag acctgcgggt accgagagga ccgcatgctc 1320
tggctatatt acttgcatg agggggagga ggaatgctg acctcgagca gagccagcaa 1380
gtatttttga aaggaataaa aacaaaaatt ggcttagtgt acagatgtat aatatatatg 1440
cactacaggg tgtgtgtgcc tcttgatatc tccgtgctg tgtgtccctc ttgaggcttg 1500

AK 179

FuenteCIP.ST25

```

cccatctgac aaccgctgt gtacataggc caacgcaagt cttcagcatg gcaccctctt 1560
ctttttcctt ttttttttct cataagtaat tttgaaggag agaataattt gatttctaag 1620
actcccaaaa catcaagtgc tctggtggtc ggaattctac aagtgcgaaa gttcctttct 1680
tttttttgtt tcgagatagg aatggcttca ggttgtgctg cctatgcttt ggccacactt 1740
tggaacacct gcaacagcga attaactggt gtaggcctgt gacacttgca cagccgtggt 1800
tttttttttt tttttttag ttttgcagta ataaaaactt gttatggaaa gagtgcatta 1860
tgctatggca ttgtctgctg ctatgcttat tggaatgcat gcctgatgtg tgttgtgctt 1920
gaggatagtg aagtgggtatt gcaggggttg aaaggagctt anaatgcctt ctggcttttg 1980
cataagcgtg gctttgggtg tcgtctgagc ttgtcaatca cagtgcaca tgcaacttgt 2040
ccaattggtt tattggggac tgcttttggg tgcagagttt gactaatttt tagtaatgct 2100
tcaaattgcaa cgcttctgtg ttgatcgag ttcacaaact cgtcgatcat tatgcatgtg 2160
aaaaactgct cacgtaaact gtatgttgat atcacagttg cactgaggaa gcctggctta 2220
agatgggtgtg tgcaagtgtc tggcacactg cgtattttcc agcataaagc tggtagtgta 2280
caggtgctgc tgtagtagc aaactttctg ccattgctgc cacaattcat gcatgaatga 2340
gtgttgggga gtatgttagt ttatcttttc aaaactgatt tgaagtacca gtgtcctata 2400
tttttgccat tgcattaata tggatcctgc attgtttacg gaaaaaagtg ataacattaa 2460
ttatgaaaga tattaagcga gtttattgac tttccagga gaatttagac caggaggcac 2520
tacatagcct gtggctctgct ttgttatgtt gacttggttt ttgtggaaat tagttctaaa 2580
agtttacaat ctttttggca tgacttgttt gcattgccat tgtaatttgg ccattattag 2640
aataaaggca ctctctcagt acctaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2693

```

<210> 4
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> Ixodes scapularis
 <400> 4

Met Ala Cys Ala Thr Leu Lys Arg Thr His Asp Trp Asp Pro Leu His
1 5 10 15

Ser Pro Asn Gly Arg Ser Pro Lys Arg Arg Arg Cys Met Pro Leu Ser
20 25 30

Val Thr Gln Ala Ala Thr Pro Pro Thr Arg Ala His Gln Ile Asn Pro
35 40 45

Ser Pro Phe Gly Glu Val Pro Pro Lys Leu Thr Ser Glu Glu Ile Ala
50 55 60

68-180

FuenteCIP.ST25

Ala Asn Ile Arg Glu Glu Met Arg Arg Leu Gln Arg Arg Lys Gln Leu
65 70 75 80

Cys Phe Ser Ser Pro Leu Glu Ser Gly Ser Pro Ser Ala Thr Pro Pro
85 90 95

Ala Ala Asp Cys Gly Pro Ala Ser Pro Thr Gly Leu Ser Pro Gly Gly
100 105 110

Leu Leu Ser Pro Val Arg Arg Asp Gln Pro Leu Phe Thr Phe Arg Gln
115 120 125

Val Gly Leu Ile Cys Glu Arg Met Met Lys Glu Arg Glu Ser Gln Ile
130 135 140

Arg Asp Glu Tyr Asp His Val Leu Ser Ala Lys Leu Ala Glu Gln Tyr
145 150 155 160

Asp Thr Phe Val Lys Phe Thr Tyr Asp Gln Ile Gln Lys Arg Phe Glu
165 170 175

Gly Ala Thr Pro Ser Tyr Leu Ser
180

<210> 5
<211> 1821
<212> DNA
<213> Ixodes scapularis

<220>
<221> misc_feature
<222> (1487)..(1487)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (1595)..(1595)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (1606)..(1606)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (1623)..(1623)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (1762)..(1762)

181

FuenteCIP.ST25

<223> n is a, c, g, or t
<220>
<221> misc_feature
<222> (1789)..(1789)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 5	
atggcgctcgt gtggagcatc agcgacgggt cctctcgtcc taagagtaat ttccaacact	60
gttaaaatag ttaacagcgc cggaaagata atcaaggaca tcatgaacag tggaaacctc	120
ggaatcgtcg aaaaggaagg catcaatgac ctgcaaacgg aggcagacag atctgttcag	180
cgctgcattg tgacttcgct ctcgagacag ttcccaaac tgacaataat tggatgaagag	240
actctggagg agaaaaagat cagcgacgac tggatcatca ccgagcatga caaggatgtc	300
ctggccactt ctctgccgga caacctgaag aacatcaaag aggaagattt ggtagtctgg	360
gttgatcctc tggatggaac caaggagtac acacagggtt tcctggacca cgtgacgac	420
ctgggtggga ttgcggttga cggtaaggca gtgggtggag tgatccacca gccgtactac	480
aactaccagg tggagaagga cgtctacaag caggagcgtt ccatgtgggg cattgtcggc	540
gtcgggtgcct ttgggatctc ggcgattgct cctccggaga acaagaggat catcactacg	600
acgcgctccc attccagccc caccatcaac agctgcattg aagccatgaa tccggacgag	660
gtgctgcgag ttggagggtc cgggcacaag gtgctgctgt tgattgaggg caaggctcac	720
gcttacgtgt ttcccagcaa aggggtgcaag aaatgggaca cttgtgcccc cgaagcgatt	780
cttcatgcca ctggcggcct tcttacagat gttcacggga acagattgga gtaccacaag	840
gacgtggaac acgtcaatgc cggcggcggt cttgccacct gcctgaagga acaacacgaa	900
tggttcaaga accacattcc cgaagatgtc cgcaagacgc ttctctatg agcaacctgc	960
cgttgtccgt tgcgatcaca ctcaagtcgc gtttttctt taactttgtg gtgatgcgggt	1020
tcaaagtctt atactattag tgttttggtg gtccaaatat tattactaaa aaaaccgga	1080
gacatgggac acaaaaaaat ggagggggcg gacaataagg tctcgaacac agctcgtaca	1140
gaatttttta aaataatgtt gatttcaggt ttatttgtgg aaactctgaa attaacggt	1200
atgtcattat ttgggttgtg ccgtttgaaa ttttatgaaa tacgtaatag ctgcacgcat	1260
tttgaggcc actcagctcc ttgaatgctc gatgcttgat gcttctgcca acattatttg	1320
tatctcaagt ttttctacca caagaaacag taccctaaca ttttgaaata gtattactag	1380
cttggatttt atctpgtatg catatataag atctatggat gttcctaagg agggcatgaa	1440
tttgaacat accctgtcct taccaacctt caaacatttt tttttngcc tgcttaaag	1500
cacttacatt gcttgatcgt tgaattaatt ttttagctga tgtaaggac acttataata	1560
attaaggaaa tgagatcgt cttgagcttg tttngcctc tgtaanaatt gatgctcttt	1620
canacctaat gcttaatgca acaataatta tcaagtaatc cttactcagg tgtcagatat	1680

182

FuenteCIP.ST25

gcaagcagat gccaatgctt ctgttcattg agtggcaaaa ggcattgctc tttgtcacat 1740
 tgcattgcatt tatgacagcc cnccttaata aactataatg cagctaant gaaaaaaaaa 1800
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 1821

<210> 6
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Ixodes scapularis

<400> 6

Met Ala Ser Cys Gly Ala Ser Ala Thr Gly Pro Leu Val Leu Arg Val
 1 5 10 15
 Ile Ser Asn Thr Val Lys Ile Val Asn Ser Ala Gly Lys Ile Ile Lys
 20 25 30
 Asp Ile Met Asn Ser Gly Asn Leu Gly Ile Val Glu Lys Glu Gly Ile
 35 40 45
 Asn Asp Leu Gln Thr Glu Ala Asp Arg Ser Val Gln Arg Cys Ile Val
 50 55 60
 Thr Ser Leu Ser Arg Gln Phe Pro Lys Leu Thr Ile Ile Gly Glu Glu
 65 70 75 80
 Thr Leu Glu Glu Lys Lys Ile Ser Asp Asp Trp Ile Ile Thr Glu His
 85 90 95
 Asp Lys Asp Val Leu Ala Thr Ser Leu Pro Asp Asn Leu Lys Asn Ile
 100 105 110
 Lys Glu Glu Asp Leu Val Val Trp Val Asp Pro Leu Asp Gly Thr Lys
 115 120 125
 Glu Tyr Thr Gln Gly Phe Leu Asp His Val Thr Ile Leu Val Gly Ile
 130 135 140
 Ala Val Asp Gly Lys Ala Val Gly Gly Val Ile His Gln Pro Tyr Tyr
 145 150 155 160
 Asn Tyr Gln Val Glu Lys Asp Val Tyr Lys Gln Gly Arg Thr Met Trp
 165 170 175
 Gly Ile Val Gly Val Gly Ala Phe Gly Ile Ser Arg Ile Ala Pro Pro
 180 185 190

ext 183

FuenteCIP.ST25

Glu Asn Lys Arg Ile Ile Thr Thr Thr Arg Ser His Ser Ser Pro Thr
195 200 205

Ile Asn Ser Cys Ile Glu Ala Met Asn Pro Asp Glu Val Leu Arg Val
210 215 220

Gly Gly Ala Gly His Lys Val Leu Leu Leu Ile Glu Gly Lys Ala His
225 230 235 240

Ala Tyr Val Phe Pro Ser Lys Gly Cys Lys Lys Trp Asp Thr Cys Ala
245 250 255

Pro Glu Ala Ile Leu His Ala Thr Gly Gly Leu Leu Thr Asp Val His
260 265 270

Gly Asn Arg Leu Glu Tyr His Lys Asp Val Glu His Val Asn Ala Gly
275 280 285

Gly Val Leu Ala Thr Cys Leu Lys Glu Gln His Glu Trp Phe Lys Asn
290 295 300

His Ile Pro Glu Asp Val Arg Lys Thr Leu Pro Leu
305 310 315

<210> 7
<211> 697
<212> DNA
<213> Ixodes scapularis

<220>
<221> misc_feature
<222> (573)..(573)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 7
gacctcaagg aaggcatctg cccgcaggcc ttctggctca acaaggagca gtgttgctgg 60
gcctccaacg ataccttctt taagggggac gactgcaagc agtgggtatcg gtggcccagag 120
atgttcgaca gcggcatgga caaggacggg gcaggctttt acctgctctc ctacctgctg 180
tacgtcatgt ggagtgtgct cttegccacc ctggccgtca tgctcgttcg caccttcgcg 240
ccctatgcct gtggatctgg aatccccggag atcaagacga ttctgagcgg cttcatcatc 300
cgcggtacc tgggcaagtg gacgctgacc atcaaatcag tgtgtctggg gctggccgtc 360
ggggcggggc tcagcctggg caaagagggg cccctgggtgc acgtggcctg ctgcatcggg 420
aacatcttct cctacctctt cccaagtac ggcaagaatg aggccaaaga gagggagatc 480
ctgtcggctg ccgccgccg gggagtttct gtggcctttg gggctcccat cggcgggtgtt 540
ctcttcagcc tcgaagaggt gagctactac ttnccttga agacgctgtg gcgttccttc 600

Page 7

64/18d

FuenteCIP.ST25

ttctgcgcc tggtggcagc ctcggtgctg cgctccatca acccctttgg caacgaccac 660
ctggtgatgt tctacgtcga gtacgacttt ccctggc 697

<210> 8
<211> 232
<212> PRT
<213> Ixodes scapularis

<220>
<221> misc_feature
<222> (191)..(191)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 8

Asp Leu Lys Glu Gly Ile Cys Pro Gln Ala Phe Trp Leu Asn Lys Glu
1 5 10 15
Gln Cys Cys Trp Ala Ser Asn Asp Thr Phe Phe Lys Gly Asp Asp Cys
20 25 30
Lys Gln Trp Tyr Arg Trp Pro Glu Met Phe Asp Ser Gly Met Asp Lys
35 40 45
Asp Gly Ala Gly Phe Tyr Leu Leu Ser Tyr Leu Leu Tyr Val Met Trp
50 55 60
Ser Val Leu Phe Ala Thr Leu Ala Val Met Leu Val Arg Thr Phe Ala
65 70 75 80
Pro Tyr Ala Cys Gly Ser Gly Ile Pro Glu Ile Lys Thr Ile Leu Ser
85 90 95
Gly Phe Ile Ile Arg Gly Tyr Leu Gly Lys Trp Thr Leu Thr Ile Lys
100 105 110
Ser Val Cys Leu Val Leu Ala Val Gly Ala Gly Leu Ser Leu Gly Lys
115 120 125
Glu Gly Pro Leu Val His Val Ala Cys Cys Ile Gly Asn Ile Phe Ser
130 135 140
Tyr Leu Phe Pro Lys Tyr Gly Lys Asn Glu Ala Lys Lys Arg Glu Ile
145 150 155 160
Leu Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Val Ser Val Ala Phe Gly Ala Pro
165 170 175

03/18/05

FuenteCIP.ST25

Ile Gly Gly Val Leu Phe Ser Leu Glu Glu Val Ser Tyr Tyr Xaa Pro
180 185 190

Leu Lys Thr Leu Trp Arg Ser Phe Phe Cys Ala Leu Val Ala Ala Ser
195 200 205

Val Leu Arg Ser Ile Asn Pro Phe Gly Asn Asp His Leu Val Met Phe
210 215 220

Tyr Val Glu Tyr Asp Phe Pro Trp
225 230

<210> 9
<211> 1221
<212> DNA
<213> Ixodes scapularis

<220>
<221> misc_feature
<222> (713)..(713)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 9
gtttcttgtt acggtagtgg agtgctgagt ttactcgata atatctgaga aatagtggca 60
atatcaattt ttctgtaat tagaatgta accaatggcg tggctatctt ctagtcgaca 120
ctaactctc ggatctgctg ttcaaagtcc cgggcgatca agccgtattt gttgtccagc 180
tgccaagtgc gtcgaatatg atgccgaaaa agaaagaatc agtcgcgagc tctaaagaag 240
acgcgccgat cgacgtgatc ggcttgccct cccacaaacg acacaagaag cacaagcaca 300
aaaagcaca ggcgaagcga ggcacggacc aagacgaaga ccaatcgccc gccgcgagcc 360
cgcagagcgg tggcgagggt agcagcagca agcccgcgct caagctcaag atcaagatcg 420
gcggacagac ggtcgagaag aacgtgacca agctgaaaca gcagcggccg ccgccgccgg 480
accctagcga agccgatctc gccgaactcc tgatgaaacc caactcgggc gatacgagcg 540
cagacagcga tgacgaagag gaagcctggc tcgaagccct cgagtccggc aggctcgaag 600
aggtcgacga cgagctccgc aaaatgaagg acccgaccct gatgacggcc aggcagcggg 660
ccctgctcga gagcaagtcg cagaaggacg aggtcccggc gacggggatg gcnggcgtcc 720
gcggagcccc tcaaagagat gtccgaggag atgattcagc ggcggatgct gcgggccaaa 780
aagcggaagc agcaggccga agagaagaaa gagaaggaga agaagcagac gatcgagcgt 840
ctgctcaaga agtccgactc gaggtgagg gccagcaaga agttggccaa gaagagcgat 900
actcccaagg tgctgctggg caacacgcag gcaggcacgc tgctctcgtt tcccgtcggc 960
gttgcgttcc cgctgtcggc agccgtggcc caggggtacc ccgagaagac gacgtgcggc 1020
attaaggggt gtcgtaacct gaagaagtac tcgtgctcca agacaggcgt gcccctgtgc 1080

Page 9

cat 186

FuenteCIP.ST25

agcctcgagt gctacaagac gaacatgctg cagatgtgcg tctgagcggg cagctaggct 1140
tccgggctac agctgctcct tgtgtatatg tatataaagt cgagaatgct gaaaaaaaaa 1200
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 1221

<210> 10
<211> 275
<212> PRT
<213> Ixodes scapularis

<400> 10

Met Met Pro Lys Lys Lys Glu Ser Val Ala Ser Ser Lys Glu Asp Ala
1 5 10 15

Pro Ile Asp Val Ile Gly Leu Pro Ser His Lys Arg His Lys Lys His
20 25 30

Lys His Lys Lys His Lys Arg Lys Arg Gly Thr Asp Gln Asp Glu Asp
35 40 45

Gln Ser Pro Ala Ala Ser Pro Gln Ser Gly Gly Glu Gly Ser Ser Ser
50 55 60

Lys Pro Ala Leu Lys Leu Lys Ile Lys Ile Gly Gly Gln Thr Val Glu
65 70 75 80

Lys Asn Val Thr Lys Leu Lys Gln Gln Arg Pro Pro Pro Pro Asp Pro
85 90 95

Ser Glu Ala Asp Leu Ala Glu Leu Leu Met Lys Pro Asn Ser Gly Asp
100 105 110

Thr Ser Ala Asp Ser Asp Asp Glu Glu Glu Ala Trp Leu Glu Ala Leu
115 120 125

Glu Ser Gly Arg Leu Glu Glu Val Asp Asp Glu Leu Arg Lys Met Lys
130 135 140

Asp Pro Thr Leu Met Thr Ala Arg Gln Arg Ala Leu Leu Glu Ser Lys
145 150 155 160

Ser Gln Lys Asp Glu Val Pro Ala Thr Gly Met Ala Gly Val Arg Gly
165 170 175

Ala Arg Gln Arg Asp Val Arg Gly Asp Asp Ser Ala Ala Asp Ala Ala
180 185 190

✓
CA 181

FuenteCIP.ST25

Gly Gln Lys Ala Glu Ala Ala Gly Arg Arg Glu Glu Arg Glu Gly Glu
195 200 205

Glu Ala Asp Asp Arg Ala Ser Ala Gln Glu Val Arg Leu Glu Ala Glu
210 215 220

Gly Gln Gln Glu Val Gly Gln Glu Glu Arg Tyr Ser Gln Gly Val Ala
225 230 235 240

Gly Gln His Ala Gly Arg His Ala Ala Leu Val Ser Arg Arg Arg Cys
245 250 255

Val Pro Ala Val Gly Ser Arg Gly Pro Gly Val Pro Arg Glu Asp Asp
260 265 270

Val Arg His
275

- <210> 11
- <211> 1942
- <212> DNA
- <213> Ixodes scapularis

<400> 11

cgatgcaggc gatgacgggc tttgcggtgc agttcaacaa aaacagtttc gggctgactc	60
cagctcagcc gctgcagttg cagattcccc tgcagcccaa cttcccagct gatgcgagct	120
tgcagctggg aaccaacggt cccgtgcaga agatggaccc cctcaccaac cttcaggtgg	180
ccatcaagaa caatgtggac gtgttctact tcagctgcct ggtgcccattg cacgtgctga	240
gcacggagga cggcctgatg gacaagcggg tgttcctggc cacctggaaa gacatccccg	300
cccaaaacga ggtccagtac accctcgaca acgtcaacct cactgcagac caagtttccc	360
agaagctgca gaacaacaac attttcacga tagccaagag gaacgtggac ggccaggaca	420
tgctgtacca gtccctgaag ctcaccaacg gcatttggggt gttggcggag ctcaagatac	480
agcccggcaa tccaaggatc acgttgtctt tgaagacaag agcacctgaa gtggcagcag	540
gtgtacaaca aacttacgaa ctcattctac acagctgagg ctgctgtgaa tgaaactctt	600
ctcccacccc cttcttttga tggcagtcaa tgtctcgttt cattttcttg tttcttttg	660
cpgcgtgcta cpgaacaagg tcctacattc ccaagttata tgggtgtgtc gcgtaggggg	720
cagagtgccg ctgagcccg cagagccttg tttctgagga gagccgaacg caccatttcg	780
aaaaagaaaa agtgaaaacg gaaaaatgaa aaattttcca gttgcttcaa attaacattc	840
ctcgtagtca gtctgtggcc gttgagtttg gtgtaaagaa gaaaaagggtg tctcttttag	900
tgaaaatggg tgctttttat tggatatccc tatcacaccg agcacgaaca taagaaatcc	960
tgacaaggat tctccttttag ttgtattatg gtggctggag cacacgaggc acctgttgcc	1020

Page 11

188

FuenteCIP.ST25

aattcgaccc agcaaagccc caattctcaa gatttgaggtt cattgaggtt gttttgctcc 1080
tcccccccca ccccccaact ttgtcgttgg attgtctaac agtgtaaag ggcgacgact 1140
cgttattctt tttttcttca ttctttcttt ttgttgtcac gcgccccggg ggacgcgaca 1200
caacttatgt gcataattga tttcacagg ctgcgacgca gtctgtaaaa gaaggggaag 1260
tgaaactctg ctccgccgct gctagtgtca tcacgggacg accatcgctt tttctctgac 1320
tatttaaaca aaactgcata gcttaggggg cagtctgtgc aaagtggaac aaccaaactg 1380
agccctgccc tttcgggtgtg tgtacaagca tctctgtgta acatgaacta ctttacatga 1440
actacattgc atgaacggga gaagtttagt tgtttttttg tttttttttt caggtgacta 1500
tgtcaacaga ttagaaccat ttttggaac ggctggaaag ataaccgctc attttgtttc 1560
tactaaaaga ctacgaaaag tgttgacttt ttgcatcggt ttggcaacgt ttgtttggca 1620
tgcatgtagt tgagcgtaat ggtatcacc ctcgtaaaca ataacagtgc aatggagcag 1680
tactgtagtg tccattaaag agcgagagtt tggttaaagg ttgttaattg aggtccgtgt 1740
tatcctttga gtaggagagc ggcacttttt gcaaatacg ctgctggggg cgtcatatct 1800
gccctccaaa acatgcacat ttaagtgtg aattgttgcg gcggcttgta caagtatgtg 1860
tgttatgtgt agaaaaagaa ctcttaatta aaatatttgt ggccaaaacg tcaaaaaaaaa 1920
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1942

<210> 12
<211> 191
<212> PRT
<213> Ixodes scapularis
<400> 12

Met Gln Ala Met Thr Gly Phe Ala Val Gln Phe Asn Lys Asn Ser Phe
1 5 10 15
Gly Leu Thr Pro Ala Gln Pro Leu Gln Leu Gln Ile Pro Leu Gln Pro
20 25 30
Asn Phe Pro Ala Asp Ala Ser Leu Gln Leu Gly Thr Asn Gly Pro Val
35 40 45
Gln Lys Met Asp Pro Leu Thr Asn Leu Gln Val Ala Ile Lys Asn Asn
50 55 60
Val Asp Val Phe Tyr Phe Ser Cys Leu Val Pro Met His Val Leu Ser
65 70 75 80
Thr Glu Asp Gly Leu Met Asp Lys Arg Val Phe Leu Ala Thr Trp Lys
85 90 95

AX 189

FuenteCIP.ST25

Asp Ile Pro Ala Gln Asn Glu Val Gln Tyr Thr Leu Asp Asn Val Asn
100 105 110

Leu Thr Ala Asp Gln Val Ser Gln Lys Leu Gln Asn Asn Asn Ile Phe
115 120 125

Thr Ile Ala Lys Arg Asn Val Asp Gly Gln Asp Met Leu Tyr Gln Ser
130 135 140

Leu Lys Leu Thr Asn Gly Ile Trp Val Leu Ala Glu Leu Lys Ile Gln
145 150 155 160

Pro Gly Asn Pro Arg Ile Thr Leu Ser Leu Lys Thr Arg Ala Pro Glu
165 170 175

Val Ala Ala Gly Val Gln Gln Thr Tyr Glu Leu Ile Leu His Ser
180 185 190

<210> 13
<211> 1428
<212> DNA
<213> Ixodes scapularis

<220>
<221> misc_feature
<222> (701)..(701)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 13
cgcgccgtgc agaagctgcg tcgggaggtt gagaaggcaa agaggaccct gtccactgct 60
caccaggcca ggatcgagat tgaatcggtc ttcgagggag aggacttcag tgagaccctg 120
actcgtgcta agtttgagga gctgaacatg gaccttttcc gttccaccat gaagcctggt 180
cagaaggtag tcgaggatgg tgacctcaag aagactgatg tggacgagat tgtgcttgct 240
ggagggtcca ccaggatccc caagggtcaa cagctgggtc aggagttctt caatggcaag 300
gaacccaccc gtggcatcaa ccccgacgaa gcagtcgcct acggtgccgc cgtgcaggct 360
ggagtcctcg gcggagagga agacactggg gacctcgtgc tgttgacgt gaaccctctg 420
accctcggca tcgagacagt gggaggcgtc atgacgaaac tgatcccccg taacacagtc 480
atccccacga agaagtctca gatcttctcc acggcctcgg acgagcagag cactgtcacc 540
atccagggtc ttgaggggga gcgtcccctg acaaaggaca accaccagct gggcaagttc 600
gacctgactg gcatcccacc tgctcctcga ggtgtgcccc aaatcgaggt gaccttcgag 660
attgacgtca acggtatcct gcgggtcagt gcagaggaca ngggtacagg caacaagcag 720
aagatcacca tcaacaatga ccagaacagg ctgacgcctg aggacatcga gaggatggta 780

62/190

FuenteCIP.ST25

aaggacgccg aaaagtttgc cgacgaggac aagaaggtca aggagaaggt ggaggcccg 840
aacgaactgg agtcttatgc ctactccctc aagaaccaga ttggagacaa ggagaagatg 900
ggaggcaagc tctccgacga ggacaagaag actattgagc aagctgtgga cgagaaaatc 960
aatggctgg agcagcacag tgacgctgat gcggaagaac tcaaggaaca gaagaaacag 1020
ctggctgata ctgtgcagcc gattgtagcc aagctgtacc ctgcaggagg caccaccg 1080
ccgacggaca aagatgactc tacaaaggac gagttgtaaa aacaaggcca gatctcttgg 1140
gtacagcgaa aggcattggg cagcagcatt atcacaagtc atctgttacg atcatgagct 1200
catcatttca ccacctctac agtgctgctg ctgcctgcct ttggctgggt tgagtgttct 1260
tggacctatt taccatgatc attctctgta caaaaacaat tctttctgtg tttttttttt 1320
tttcgttgta gtaacttaag ttatacagat gtcttctact ggggtgggctt tctccatgag 1380
tgggaggggg ctgggtgtca aataaaagtg tttctattaa aaaaaaaa 1428

<210> 14
<211> 372
<212> PRT
<213> Ixodes scapularis

<220>
<221> misc_feature
<222> (234)..(234)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 14

Arg Ala Val Gln Lys Leu Arg Arg Glu Val Glu Lys Ala Lys Arg Thr
1 5 10 15

Leu Ser Thr Ala His Gln Ala Arg Ile Glu Ile Glu Ser Phe Phe Glu
20 25 30

Gly Glu Asp Phe Ser Glu Thr Leu Thr Arg Ala Lys Phe Glu Glu Leu
35 40 45

Asn Met Asp Leu Phe Arg Ser Thr Met Lys Pro Val Gln Lys Val Leu
50 55 60

Glu Asp Gly Asp Leu Lys Lys Thr Asp Val Asp Glu Ile Val Leu Val
65 70 75 80

Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys Val Gln Gln Leu Val Lys Glu Phe
85 90 95

Phe Asn Gly Lys Glu Pro Thr Arg Gly Ile Asn Pro Asp Glu Ala Val
100 105 110

OK 111

FuenteCIP.ST25

Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala Gly Val Leu Gly Gly Glu Glu Asp
115 120 125

Thr Gly Asp Leu Val Leu Leu Asp Val Asn Pro Leu Thr Leu Gly Ile
130 135 140

Glu Thr Val Gly Gly Val Met Thr Lys Leu Ile Pro Arg Asn Thr Val
145 150 155 160

Ile Pro Thr Lys Lys Ser Gln Ile Phe Ser Thr Ala Ser Asp Glu Gln
165 170 175

Ser Thr Val Thr Ile Gln Val Phe Glu Gly Glu Arg Pro Leu Thr Lys
180 185 190

Asp Asn His Gln Leu Gly Lys Phe Asp Leu Thr Gly Ile Pro Pro Ala
195 200 205

Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Glu Ile Asp Val Asn
210 215 220

Gly Ile Leu Arg Val Ser Ala Glu Asp Xaa Gly Thr Gly Asn Lys Gln
225 230 235 240

Lys Ile Thr Ile Asn Asn Asp Gln Asn Arg Leu Thr Pro Glu Asp Ile
245 250 255

Glu Arg Met Val Lys Asp Ala Glu Lys Phe Ala Asp Glu Asp Lys Lys
260 265 270

Val Lys Glu Lys Val Glu Ala Arg Asn Glu Leu Glu Ser Tyr Ala Tyr
275 280 285

Ser Leu Lys Asn Gln Ile Gly Asp Lys Glu Lys Met Gly Gly Lys Leu
290 295 300

Ser Asp Glu Asp Lys Lys Thr Ile Glu Gln Ala Val Asp Glu Lys Ile
305 310 315 320

Lys Trp Leu Glu Gln His Ser Asp Ala Asp Ala Glu Glu Leu Lys Glu
325 330 335

Gln Lys Lys Gln Leu Ala Asp Thr Val Gln Pro Ile Val Ala Lys Leu
340 345 350

Tyr Pro Ala Gly Gly Thr Pro Pro Pro Thr Asp Lys Asp Asp Ser Thr
Page 15

102 192

355

360

FuenteCIP.ST25
365

Lys Asp Glu Leu
370

<210> 15
<211> 1847
<212> DNA
<213> Ixodes scapularis

<220>
<221> misc_feature
<222> (1814)..(1814)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 15
cgacgtgttt gtgagtgcag cgggtgaactg gacggtgtcg tggccacgcg atggcagcgg 60
cggatgatgaa ctgcctacgg actgcgcttt taggcgctct cgtcgtccaa ctctacgcc 120
cgagatagg tcaccggaaa ttcgagtaca agtacagttt caagggaccc tacctggcgc 180
agaaggatgg atcgggtgcct ttctgggagt acggcggcaa ttgcatcgcc agtgaggaga 240
tggttcggat caccgcttcc ctgaagagca agaaaggatc catctggtcc aagctgccga 300
catcgttccc ttggtgggag gtggagctgg tgttccgcac cacgggtacg ggcaggatag 360
gagctgacgg cctggccttc tggtacacag acaagaagca ggcggagggt cctgtctttg 420
gaagcagcga caagtggact ggcctggcca tcttcttcga ttccttcgac aatgataaca 480
agcacaacaa cccatacatc atgggcatgg tgaacgatgg aacaaaagcc tacgatcatg 540
agagtgcagg tgccaaccaa cagctagcgg gatgccagcg ggacttccgc aacaagcctt 600
accctgtcag ggccaagata gaatacttca acaacattct cacggtgctg ttccacaacg 660
gcaacaccaa caacgacggt gactacgaga tgtgttccg tgcggagAAC gtgttcttgc 720
cgaccaacgg ccactttggg gtgtccgccg ccacgggggg cctggcagac gaccacgacg 780
ccctcaagtt cctgacgacg agcctgcatt cggagggcac gcagccggcc ctggcccagg 840
gtatggccga ctgagagaag gagaagttct ccaaggagta tgaagtatac aaggacaagc 900
tggaagagca gaaggaggag taccggaaga cgcacccgga ggaggccgct aagcaggcca 960
tgagacacgg ccccgagcag gcctacgaca cgcagcagca gcgcgagctg cgccagatct 1020
tcgagggcca gagccacaaa ttgtttgagg ggctcaaggc actgcaccgc aagctggacg 1080
aggtgctcgg gcgccaggag cgcaccctgt cgctgggtgtc ggctggcggc gccggcgtgg 1140
ccgtgggcgg tgttccgcca ccgcagatgg gtggagtgcc gtcgctgcag aggcacgaag 1200
cagagtccct gctgagcagc cagcgggagc tgctgcagac ggtggctcag gtcaagagct 1260
ttgtggccga ggtgcatcaa cgcacggcca ccctgcaaca ccagggggcg ggaggcacc 1320

101 193

FuenteCIP.ST25

agggcctcac ggccgagcag ctgcaagtgc tccaccaggt gcgggacagc gtggccagca 1380
 tgcaccggga cgtctccaac aaccagccgc agaggactgg ctgcgcgaca tcctgtctca 1440
 gcactaccca cttcttgctg tttgcaacgt tgcagttggc tgtcacgctg ggctacttgg 1500
 tgtacaggag cagcaaagag gcggcgccca agaagttcta ctgagtgcag atctcgagcc 1560
 ttgccttgcc ctccccctcc atggagtggc ccttaacccc acagactgcc agaaaccagt 1620
 gttgccagag gagccccctt cccttcttat tgggtggggg gccacagcca tcaccattc 1680
 ttcgagacaa ggccactgtt tggggggagg ggcaagagat tcattccgggg tgcgcaacaa 1740
 aacatggccg tacagagggg ggggtgctcc agaactgggt cccagccaca tcgttgctg 1800
 ggagcgcctt tctnctcac tctaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1847

<210> 16
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> Ixodes scapularis
 <400> 16

Met Ala Ala Ala Val Met Asn Cys Leu Arg Thr Ala Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Leu Val Val Gln Leu Tyr Ala Thr Gln Ile Gly His Arg Lys Phe Glu
 20 25 30

Tyr Lys Tyr Ser Phe Lys Gly Pro Tyr Leu Ala Gln Lys Asp Gly Ser
 35 40 45

Val Pro Phe Trp Glu Tyr Gly Gly Asn Cys Ile Ala Ser Glu Glu Met
 50 55 60

Val Arg Ile Thr Pro Ser Leu Lys Ser Lys Lys Gly Ser Ile Trp Ser
 65 70 75 80

Lys Leu Pro Thr Ser Phe Pro Trp Trp Glu Val Glu Leu Val Phe Arg
 85 90 95

Thr Thr Gly Thr Gly Arg Ile Gly Ala Asp Gly Leu Ala Phe Trp Tyr
 100 105 110

Thr Asp Lys Lys Gln Ala Glu Gly Pro Val Phe Gly Ser Ser Asp Lys
 115 120 125

Trp Thr Gly Leu Ala Ile Phe Phe Asp Ser Phe Asp Asn Asp Asn Lys
 130 135 140

His Asn Asn Pro Tyr Ile Met Gly Met Val Asn Asp Gly Thr Lys Ala
 Page 17

102
194

FuenteCIP.ST25
155

145

150

160

Tyr Asp His Glu Ser Asp Gly Ala Asn Gln Gln Leu Ala Gly Cys Gln
165 170 175

Arg Asp Phe Arg Asn Lys Pro Tyr Pro Val Arg Ala Lys Ile Glu Tyr
180 185 190

Phe Asn Asn Ile Leu Thr Val Leu Phe His Asn Gly Asn Thr Asn Asn
195 200 205

Asp Gly Asp Tyr Glu Met Cys Phe Arg Ala Glu Asn Val Phe Leu Pro
210 215 220

Thr Asn Gly His Phe Gly Val Ser Ala Ala Thr Gly Gly Leu Ala Asp
225 230 235 240

Asp His Asp Ala Leu Lys Phe Leu Thr Thr Ser Leu His Ala Glu Gly
245 250 255

Thr Gln Pro Ala Leu Ala Gln Gly Met Ala Asp Ser Glu Lys Glu Lys
260 265 270

Phe Ser Lys Glu Tyr Glu Val Tyr Lys Asp Lys Leu Glu Lys Gln Lys
275 280 285

Glu Glu Tyr Arg Lys Thr His Pro Glu Glu Ala Ala Lys Gln Ala Met
290 295 300

Glu His Gly Pro Glu Gln Ala Tyr Asp Thr Gln Gln Gln Arg Glu Leu
305 310 315 320

Arg Gln Ile Phe Glu Gly Gln Ser His Lys Leu Phe Glu Gly Leu Lys
325 330 335

Ala Leu His Arg Lys Leu Asp Glu Val Leu Gly Arg Gln Glu Arg Thr
340 345 350

Leu Ser Leu Val Ser Ala Gly Gly Ala Gly Val Ala Val Gly Gly Val
355 360 365

Pro Pro Pro Gln Met Gly Gly Val Pro Ser Leu Gln Arg His Glu Ala
370 375 380

Glu Ser Leu Leu Ser Ser Gln Arg Glu Leu Leu Gln Thr Val Ala Gln
385 390 395 400

103 195

FuenteCIP.ST25
Val Lys Ser Phe Val Ala Glu Val His Gln Arg Thr Ala Thr Leu Gln
405 410 415
His Gln Gly Ala Gly Gly Thr Gln Gly Leu Thr Ala Glu Gln Leu Gln
420 425 430
Val Leu His Gln Val Arg Asp Ser Val Ala Ser Met His Arg Asp Val
435 440 445
Ser Asn Asn Gln Pro Gln Arg Thr Gly Cys Ala Thr Ser Cys Leu Ser
450 455 460
Thr Thr His Phe Leu Leu Phe Ala Thr Leu Gln Leu Ala Val Thr Leu
465 470 475 480
Gly Tyr Leu Val Tyr Arg Ser Ser Lys Glu Ala Ala Ala Lys Lys Phe
485 490 495

Tyr

<210> 17
<211> 2475
<212> DNA
<213> Ixodes scapularis

<220>
<221> misc_feature
<222> (1342)..(1342)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (1388)..(1388)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 17
catcactagt agcgagacac gtgcgtaaaa atggggccca aaacgctgtc taagcagccc 60
gctaaagctt cttcatccac ttccaagcgc accgccggcc ccacaataag caagcagacg 120
gaggacagcg atgacgaagg gtcaagcagc gcctactccg acttgaggga ctccgaagga 180
gccgacagca ggcactcgaa cgatttgtcg gacacggagg cgtcggagga tgactacgat 240
gactcccaag acgaagaaaa cacgaagatt actttgactg ggggtggaggga gaaggacctt 300
gagttgaggg ggaaggacca ggaggaccg gtggagtctg gcaaaagggtc ggcatggcac 360
cggcagcaag aggacgcaa ggaggacaga cgaacgcaag tgggtggaaga tgaatatgcc 420
tttgactctt ccgacgaaga ggacgttcgc aacacggttg gcaacattcc tctggagtgg 480
tacgagcact atccgcacat cggttatgat ctggaaggca agccaatcct gaagccgcct 540

104/196

FuenteCIP.ST25

cggttagtg	acctggacga	cttcctgagg	aaaatggatg	accccaacta	ttggaggacg	600
gtgaaggaca	agagcacggg	acaggacgtt	gtcctgaccg	acgaagatgt	ggacctgatt	660
cagaggctgc	agaaaggaca	gttccccagc	tcgacgactg	acccttacga	gccatttgag	720
gacatctttt	cgcacgagac	catgatccac	ccggtgacca	ggcaccctcc	ccagaaacgc	780
agcttcgtgc	cttcaaggat	agaaaaagca	atggtgtcaa	agatggtgca	cgcaatcaag	840
atgggctgga	tcaagccccg	agtaaagaag	catgaccag	aaagattcag	cctcctgtgg	900
gacaaggatg	actcgacagc	gggcagcaat	gagcgaatgc	agcgccacat	cccggcacc	960
aagatgaagc	tgccgggtca	tgaggagtct	tacaaccgc	cgccgaata	cctcttcacc	1020
gaggaagagg	aggccaagt	gagagagcag	gagcccgaag	aacggcgcat	aaacttcctg	1080
cccgccaaagt	acccatgtct	gcgcgcagtc	ccagcctacg	aacgcttcat	tgaggagagg	1140
tttgagcgct	gtctggatct	ctacttgctg	ccgaggcagc	ggaagatgag	ggtgaatgtg	1200
gatgcagagg	acctgattcc	tcagctgccc	aaaccaagg	acctgcagcc	tttcccaagc	1260
attcagtcta	ttgtctatga	gggtcatacg	gactgtgtcc	tctgcctgtc	tttgagacct	1320
gcgggacagt	tctttgcatc	anggtccgag	gacggcaccg	ttcgcatctg	ggagctcttg	1380
acgggcangt	gcctcaagaa	gttccagttc	gaggcgcccc	tgaagagcgt	ggcctggtgt	1440
ccagttgtcg	ttcccatgaa	actctgcgtg	gacaagactg	tttccatgct	ggatgccgga	1500
gttacggaca	aactgctgcc	gttcaccacg	ggacaccgag	ttgtctgccc	tccccgaaga	1560
gtcctcgggc	caggcggcgg	tagtgagtg	ggagcagacg	tcggcctcct	ctccagagtt	1620
cctctccccg	ggggagcgtc	tgccgggtcgt	tcaccgccac	ggtgtggtgc	aggtgacgtg	1680
gcactcgagg	ggagactact	ttgccactgt	cacggacgag	ggacaggcca	ccgtgcttgt	1740
ccatcagttg	tccacgcggc	ggttcgcagg	ctccccctca	gcaaggcgaa	gggcgggggtg	1800
tccccgggtg	tgttccacc	gctgcgcccc	ttcctgctgg	tgccgtgcca	gcgcacagtg	1860
cggtctacc	acctgtcaa	gcaggagctg	gccaagaggc	tcacatccaa	ttgcaagtgg	1920
atctcgtgca	tgggccgtcc	acccccaggt	gacaatctgc	tgatcggcac	gtacgagaag	1980
cggtgatgt	ggttcgatct	ggacctctcg	accaaacctg	accagcagct	gcgcatacac	2040
aatgccgcca	tccgcagtgt	ggcgttccat	ccgcgctatc	cactgtttgc	gtccgccggc	2100
gacgatcgca	gcgtgatcgt	ttcgcacggt	atggtgtaca	atgatttact	gcaaaaccca	2160
ctgatcgtgc	cactgagacg	gctgaagaac	catgccatca	gcaagggtat	gggtgtgttg	2220
gactgcgcct	tccatcccca	ccagccgtgg	atagtcacgg	ccggagcaga	cagcacgctg	2280
cggtctttca	cctaagccgg	gacgtcgtct	ggtgtacata	gtgaatcgtc	aagaccgtgc	2340
caataaaagg	actccacacc	taaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	2400
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	2460

10) 197

FuenteCIP.ST25

aaaaaaaaaa aaaaa

2475

<210> 18
<211> 754
<212> PRT
<213> Ixodes scapularis

<220>
<221> misc_feature
<222> (438)..(438)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (453)..(453)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 18

Met Gly Pro Lys Thr Leu Ser Lys Gln Pro Ala Lys Ala Ser Ser Ser
1 5 10 15

Thr Ser Lys Arg Thr Ala Gly Pro Thr Ile Ser Lys Gln Thr Glu Asp
20 25 30

Ser Asp Asp Glu Gly Ser Ser Ser Ala Tyr Ser Asp Leu Glu Asp Ser
35 40 45

Glu Gly Ala Asp Ser Ser Asp Ser Asn Asp Leu Ser Asp Thr Glu Ala
50 55 60

Ser Glu Asp Asp Tyr Asp Asp Ser Gln Asp Glu Glu Asn Thr Lys Ile
65 70 75 80

Thr Leu Thr Gly Val Glu Gly Lys Asp Leu Glu Leu Arg Gly Lys Asp
85 90 95

Gln Glu Ala Pro Val Glu Ser Gly Lys Arg Ser Ala Trp His Arg Gln
100 105 110

Gln Glu Asp Ala Lys Glu Asp Arg Arg Thr Gln Val Val Glu Asp Glu
115 120 125

Tyr Ala Phe Asp Ser Ser Asp Glu Glu Asp Val Arg Asn Thr Val Gly
130 135 140

Asn Ile Pro Leu Glu Trp Tyr Glu His Tyr Pro His Ile Gly Tyr Asp
145 150 155 160

Leu Glu Gly Lys Pro Ile Leu Lys Pro Pro Arg Val Ser Asp Leu Asp

Page 21

198

FuenteCIP.ST25
170

165

175

Asp Phe Leu Arg Lys Met Asp Asp Pro Asn Tyr Trp Arg Thr Val Lys
180 185 190

Asp Lys Ser Thr Gly Gln Asp Val Val Leu Thr Asp Glu Asp Val Asp
195 200 205

Leu Ile Gln Arg Leu Gln Lys Gly Gln Phe Pro Ser Ser Thr Thr Asp
210 215 220

Pro Tyr Glu Pro Phe Glu Asp Ile Phe Ser His Glu Thr Met Ile His
225 230 235 240

Pro Val Thr Arg His Pro Pro Gln Lys Arg Ser Phe Val Pro Ser Arg
245 250 255

Ile Glu Lys Ala Met Val Ser Lys Met Val His Ala Ile Lys Met Gly
260 265 270

Trp Ile Lys Pro Arg Val Lys Lys His Asp Pro Glu Arg Phe Ser Leu
275 280 285

Leu Trp Asp Lys Asp Asp Ser Thr Ala Gly Ser Asn Glu Arg Met Gln
290 295 300

Arg His Ile Pro Ala Pro Lys Met Lys Leu Pro Gly His Glu Glu Ser
305 310 315 320

Tyr Asn Pro Pro Ala Glu Tyr Leu Phe Thr Glu Glu Glu Glu Ala Lys
325 330 335

Trp Arg Glu Gln Glu Pro Glu Glu Arg Arg Ile Asn Phe Leu Pro Ala
340 345 350

Lys Tyr Pro Cys Leu Arg Ala Val Pro Ala Tyr Glu Arg Phe Ile Glu
355 360 365

Glu Arg Phe Glu Arg Cys Leu Asp Leu Tyr Leu Cys Pro Arg Gln Arg
370 375 380

Lys Met Arg Val Asn Val Asp Ala Glu Asp Leu Ile Pro Gln Leu Pro
385 390 395 400

Lys Pro Lys Asp Leu Gln Pro Phe Pro Ser Ile Gln Ser Ile Val Tyr
405 410 415

10/19

FuenteCIP.5T25

Glu Gly His Thr Asp Cys Val Leu Cys Leu Ser Leu Glu Pro Ala Gly
420 425 430

Gln Phe Phe Ala Ser Xaa Ser Glu Asp Gly Thr Val Arg Ile Trp Glu
435 440 445

Leu Leu Thr Gly Xaa Cys Leu Lys Lys Phe Gln Phe Glu Ala Pro Val
450 455 460

Lys Ser Val Ala Trp Cys Pro Val Val Val Pro Met Lys Leu Cys Val
465 470 475 480

Asp Lys Thr Val Ser Met Leu Asp Ala Gly Val Thr Asp Lys Leu Leu
485 490 495

Pro Phe Thr Thr Gly His Arg Val Val Cys Pro Pro Arg Arg Val Leu
500 505 510

Gly Pro Gly Gly Gly Ser Gly Val Gly Ala Asp Val Gly Leu Leu Ser
515 520 525

Arg Val Pro Leu Pro Gly Gly Ala Ser Ala Gly Arg Ser Pro Pro Arg
530 535 540

Cys Gly Ala Gly Asp Val Ala Leu Glu Gly Arg Leu Leu Cys His Cys
545 550 555 560

His Gly Arg Gly Thr Gly His Arg Ala Cys Pro Ser Val Val His Ala
565 570 575

Ala Val Arg Arg Leu Pro Phe Ser Lys Ala Lys Gly Gly Val Ser Arg
580 585 590

Val Leu Phe His Pro Leu Arg Pro Phe Leu Leu Val Ala Cys Gln Arg
595 600 605

Thr Val Arg Val Tyr His Leu Leu Lys Gln Glu Leu Ala Lys Arg Leu
610 615 620

Thr Ser Asn Cys Lys Trp Ile Ser Cys Met Gly Arg Pro Pro Pro Gly
625 630 635 640

Asp Asn Leu Leu Ile Gly Thr Tyr Glu Lys Arg Leu Met Trp Phe Asp
645 650 655

Leu Asp Leu Ser Thr Lys Pro Tyr Gln Gln Leu Arg Ile His Asn Ala
660 665 670

100/100

FuenteCIP.ST25

Ala Ile Arg Ser Val Ala Phe His Pro Arg Tyr Pro Leu Phe Ala Ser
675 680 685

Ala Gly Asp Asp Arg Ser Val Ile Val ser His Gly Met Val Tyr Asn
690 695 700

Asp Leu Leu Gln Asn Pro Leu Ile Val Pro Leu Arg Arg Leu Lys Asn
705 710 715 720

His Ala Ile Ser Lys Gly Met Gly Val Leu Asp Cys Ala Phe His Pro
725 730 735

His Gln Pro Trp Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Ser Thr Leu Arg Leu
740 745 750

Phe Thr

<210> 19
<211> 447
<212> DNA
<213> Ixodes scapularis

<400> 19
caagatgct gctgttctgc cgcacgtgcg ccaacatcct cattgtggaa caaggcttgg 60
agtgcctccg tttcgcttgc aacacatgcc cctacgtgca caacatcaag gcgaagatgt 120
cgaatcggaa gtacccgcgg ctcaaggacg tggacgacgt gtcggcggt gcagccgcct 180
gggagaatgt tgactcgacc gaagagaagt gcccgaagtg tggccatgag cgggcctatt 240
ttatgcagat ccagactagg tcggccgacg agcccatgac caccttctac aagtgtgca 300
accagctctg tggccaccag tggagggact gacagatggc ggctttgacg aactcatgcc 360
cgtgcaaaat gcgtcggggg gagagagttt tggaataaaa catgcgctt actttcataa 420
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 447

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Ixodes scapularis

<400> 20
Met Leu Leu Phe Cys Pro Thr Cys Ala Asn Ile Leu Ile Val Glu Gln
1 5 10 15

Gly Leu Glu Cys Phe Arg Phe Ala Cys Asn Thr Cys Pro Tyr Val His
20 25 30

704
201

FuenteCIP.ST25

Asn Ile Lys Ala Lys Met Ser Asn Arg Lys Tyr Pro Arg Leu Lys Asp
35 40 45
Val Asp Asp Val Leu Gly Gly Ala Ala Ala Trp Glu Asn Val Asp Ser
50 55 60
Thr Glu Glu Lys Cys Pro Lys Cys Gly His Glu Arg Ala Tyr Phe Met
65 70 75 80
Gln Ile Gln Thr Arg Ser Ala Asp Glu Pro Met Thr Thr Phe Tyr Lys
85 90 95
Cys Cys Asn Gln Leu Cys Gly His Gln Trp Arg Asp
100 105

<210> 21
<211> 1567
<212> DNA
<213> Ixodes scapularis

<220>
<221> misc_feature
<222> (785)..(785)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 21
ccccccaggc gcagggttc gttcaggtcg accagggggc cctccccgca agccccgagg 60
agcgccacct ggcaagcatg caggtcaatg gatatgagaa cccacctac aagtacttcg 120
aggccaacac caactgagcg gccacgcccc caggggaggg ggaaaagggg gcggacggac 180
gtattgtgcc tgctgcgggc tgcgggatta gctcgtcccg cgttggtccg ggagccagtt 240
ggtttgcctc gcgtcttagg agtaggcacg gcctcccttc tgcacccggt caaggaccat 300
ggttggtggg gacacgagcg gcgtggggcg cagccagcct gagctttggg tcccgttacc 360
acggcaaacc gtttggtccc acccgcgga tgaaaatttt gtttgctca gtttctttcg 420
aatcgagcgt cggcgccgcc tccgacagcc ccgagtgcac tctgtctgtt gcgaaagacc 480
aatggagtag ttgacactcg ggtcgcagct cgaacaagct cccgtaaaac gctacttaac 540
cggggccggc gaccgagcgt agagcttgct gtgcgtagtt gtggataaaa cttttttttt 600
ttgtgtgtgt gcttggtcac agacaatggg cagcttccga cgtagccac gcgccacacg 660
ctcgcctttg ttttcttctt ctcgcggttg tcatacttag tttccattgg cgggttaaca 720
ttccagtccg ggcgggcgcc cccgttcagg cgcgtcctga tcaaaattga gcatttggtt 780
gtgcngtgca tttattggcc gcagcagggg gttcccgggt gcacctggtg tcgtgacacg 840
catgtcgtga ctttcccttc agacggttgt ccttgctcat ggctcgttca cacctctagt 900
gctggtagtc tctgttgctt aggtttgtag gagcacacta cagcagaggg tgtcacaag 960
Page 25

1702

FuenteCIP.ST25

ttttctaagc tgtatataca tgaggaaaac attgcgttgc acacacgcga gtttcggcct 1020
gttttttagtt gggacagtga acgttttttg tacaggttat tatgtagtgc ctacatttgt 1080
atgtgccagc tgcattgtgtt ttcttgcattg tggggaagcc tccgtgctgc cccgagctgt 1140
gtgcggcccc tcctgagttt ccatgtgcca tgtgcccagc ctaggggtgaa ctgggggtgc 1200
agatgccctt gcgcacgggtg tgccccggcg agcattgtgt gtccgtaggc catcgacgct 1260
attcatgcga aattaatgtg gtcacagctg tcattgtctc agtgaacata tcatatgtcc 1320
aaatttgtct cccctgtcag tgtgtgcttc tcttggttct acacttgcct gcatttttgt 1380
tagtttgccg gactgtcctt ttcgggtcca ggtcgacagc aggctataac aacaattccg 1440
gtattttcca gtatcgggtc acaccagggtg taacctattg tgcattgtgt gtaacttgag 1500
tggaagagct aaaataaaaa ttgcaagag tctcactaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560
aaaaaaa 1567

<210> 22
<211> 44
<212> PRT
<213> Ixodes scapularis
<400> 22

Pro Gln Ala Gln Gly Phe Val Gln Val Asp Gln Gly Ala Leu Pro Ala
1 5 10 15
Ser Pro Glu Glu Arg His Leu Ala Ser Met Gln Val Asn Gly Tyr Glu
20 25 30
Asn Pro Thr Tyr Lys Tyr Phe Glu Ala Asn Thr Asn
35 40

<210> 23
<211> 704
<212> DNA
<213> Ixodes scapularis

<220>
<221> misc_feature
<222> (534)..(534)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (598)..(598)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 23
tgagaagaca ctagaggaca agttcttcga gcatgagggtg atgctgaatg tgaatgcgtt 60
catgcagcag ttccattccg gcgtttttta tgcctacgtg aagctgaagg aacaagagtg 120
Page 26

11/10

FuenteCIP.ST25

ccgcaacatt gtctggattg ccgaatgcgt tgctcagcgt catcgggtcca agatcgataa	180
ctacattcca atcttctagt cgctcgagga aaagaaatgg gccaattcgg tagtttgtcg	240
gtgtaatata tatatatata tatatctact tcgcaaaatt cttcagctag agtgtctatg	300
tctggtttagc tgcgattgtg cgagagggga aaaaaatgta gtcagtggca tgatcaagga	360
aggaaaaaaa ttggccaata actttttacct tttgaagtta aagcaaggggt taaaataatg	420
tctatttttta cttcgcttta ccgtgtgctg gctattgctt tgcaaacgtt ttttaaaatt	480
tttgcagttc gtctttcttc ttttgagcac atatttattc cagagttcca atancctttt	540
atgtgtgaat gaatgactaa tccatgtttg ggttggttaa tgggtgcattg ttgaaaanat	600
aaaccccaac tccagctggc ctttggaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	660
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa	704

- <210> 24
- <211> 681
- <212> DNA
- <213> Ixodes scapularis

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (432)..(432)
- <223> n is a, c, g, or t

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (467)..(467)
- <223> n is a, c, g, or t

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (472)..(472)
- <223> n is a, c, g, or t

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (481)..(481)
- <223> n is a, c, g, or t

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (493)..(493)
- <223> n is a, c, g, or t

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (495)..(495)
- <223> n is a, c, g, or t

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (499)..(499)
- <223> n is a, c, g, or t

112
704

FuenteCIP.ST25

<220>
<221> misc_feature
<222> (507)..(507)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (515)..(515)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (518)..(518)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (528)..(528)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (533)..(533)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (547)..(547)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (550)..(550)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (559)..(559)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (565)..(565)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (567)..(567)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (571)..(571)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (586)..(586)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (593)..(593)

47 205

FuenteCIP.ST25

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (599)..(599)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (603)..(603)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (606)..(606)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (611)..(611)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (619)..(619)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (623)..(623)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (625)..(625)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (627)..(627)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (651)..(651)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (658)..(658)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (666)..(666)

<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature

<222> (673)..(674)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 24

774 206

FuenteCIP.ST25

gtcacgggat ttgggaagct gtcgtctgtc gtcctgcagt ttcaaacggt ttcaccaaaa 60
acctttccgt ctcgctgtca gacgccttga accatgactg agttctggct catctcggct 120
ccgggcgaga aaacctgcc aacagacttat gacaagctgc tcagcgtcac aagcaacaag 180
cagaacaacc tctcgacctg ctacaagttc caccttcagg acttgaaggt gggtagctg 240
gatcagttgg ttggcctctc ggatgacttg ggaaagctcg acacctatgt cgaagcatc 300
actcgaagag tggccagcta tctgggggac gtgcttgacg accagagggg caaactagcc 360
gacaaccttc cttgccaatg gcttggggct ggaggcctac ctgaccccg ttttcagtgg 420
gacatggcca antaccccat caagcagttc gcctcaagag catcacntga antcatcagc 480
nagcaagtgt ctanattng accggtngaa cctcnagnag caagttanct tgnttacaac 540
aaccttnaan aacttaagnt tcaantncat ncgaaccca aatccnccgg ggnaggccng 600
gcnttnttcc ngttagcctt ggnctnacc ttattgcgcc aaggagcca nttgtcctt 660
gggggntcgg ganntacctt a 681

<210> 25
<211> 720
<212> DNA
<213> Ixodes scapularis

<220>
<221> misc_feature
<222> (488)..(488)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (625)..(625)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (627)..(627)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (631)..(631)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (641)..(641)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (680)..(680)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature

Hy 207

FuenteCIP.ST25

<222> (692)..(692)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (700)..(700)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (719)..(719)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 25
ctctcagcga ctccgacgtc caaaagcaga tcaagcacat gatggctttc atcgaccagg 60
aagccaacga aaaggcagaa gaagtagacg ccaaggcagg aagaagagtt caacatcgag 120
aagggccgccc tggtcacgga gcaaaggctc aagatcatcg actactacac ccgtcpagag 180
aagcaagttg aactgcagcg caagatccaa agctccaaca tgctgaacca ggcccggctg 240
aaggtgctga aggcgggcca ggaccacatt gcgacggtgc tggaggaggc caagcgccgc 300
ctgggggaca tcaccagga ccaggctcgc taccaagccc tctgcagag catggttctg 360
caggcactgc ttcagctcct cgagcaggag gtggtcgtcc actgccgacc gcaagacgcc 420
gggctgctga acttggacac gctgagtgcc aagttcaagg aggcactgg ccgagaggtc 480
aagctcantg tggagcccag cctggcttcg agcagctcgc gcggagtcga gatgctctcc 540
aggcggggca agattcgcgt ctgcaacacg ctcgagtcgc ggctggacat gattgccctt 600
cagctttctg ccgcagatca agacngnct nttcggcagg naccaccaac cgcaagttca 660
tggactaggc gggctattgn ccccgccatt cnggccagtn agcttggacc gtgtttacng 720

<210> 26
<211> 212
<212> DNA
<213> Dermacentor variabilis

<400> 26
atggcttgcg caacattaaa gcgaacacac gattgggatc cgctgcatag tccaaacgga 60
agatcgccca aacgacggag atgtatgcct ttgtcggta cacaagcagc gactcccca 120
acaagggcac accaaatcaa cccttcaccc ttcgggtgaag tgccaccgaa attaacttca 180
gaggagatag cggccaacat tcgggaggaa at 212

<210> 27
<211> 70
<212> PRT
<213> Dermacentor variabilis

<400> 27

Met Ala Cys Ala Thr Leu Lys Arg Thr His Asp Trp Asp Pro Leu His
1 5 10 15

110 208

FuenteCIP.ST25

Ser Pro Asn Gly Arg Ser Pro Lys Arg Arg Arg Cys Met Pro Leu Ser
20 25 30
Val Thr Gln Ala Ala Thr Pro Pro Thr Arg Ala His Gln Ile Asn Pro
35 40 45
Ser Pro Phe Gly Glu Val Pro Pro Lys Leu Thr Ser Glu Glu Ile Ala
50 55 60
Ala Asn Ile Arg Glu Glu
65 70

<210> 28
<211> 490
<212> DNA
<213> Amyloma americanum

<400> 28
atggcttgcg caacattaaa gcgaacgcac gactgggata ccctgcacag tccgaacgga 60
agatcaccaa agcggcgaag atgtatgcct ttttcagtca acccaccagc tcctccaaca 120
agggcgcacc aaatcaatcc ctgcctttc ggcgacgtgc caccaaagct gacttcagag 180
gagatagcag ccaacatccg tgaggaaatg cggcggtgc agcggcgcaa gcagctctgc 240
ttccagggtg cagagtgcag tagccccccc gaaggctgtt cccccattgg ctccccctcc 300
cagcacaccg gcggcctect gtcacctgtg cgccgagacc agcccctgtt caccttccgc 360
caagtgggac tcattctgtga gcgcatgatg aaagagcgag agagccagat acgagaggag 420
tatgaccacg tgctctccac caagcttgca gagcagtacg acacatttgt caagtttacg 480
tacgaccaa 490

<210> 29
<211> 163
<212> PRT
<213> Amyloma americanum

<400> 29
Met Ala Cys Ala Thr Leu Lys Arg Thr His Asp Trp Asp Pro Leu His
1 5 10 15
Ser Pro Asn Gly Arg Ser Pro Lys Arg Arg Arg Cys Met Pro Phe Ser
20 25 30
Val Asn Pro Pro Ala Pro Pro Thr Arg Ala His Gln Ile Asn Pro Ser
35 40 45
Pro Phe Gly Asp Val Pro Pro Lys Leu Thr Ser Glu Glu Ile Ala Ala
Page 32

117209

FuenteCIP.ST25
60

50

55

Asn Ile Arg Glu Glu Met Arg Arg Leu Gln Arg Arg Lys Gln Leu Cys
65 70 75 80
Phe Gln Gly Ala Glu Cys Ser Ser Pro Pro Glu Gly Cys Ser Pro Ile
85 90 95
Gly Ser Pro Ser Gln His Thr Gly Gly Leu Leu Ser Pro Val Arg Arg
100 105 110
Asp Gln Pro Leu Phe Thr Phe Arg Gln Val Gly Leu Ile Cys Glu Arg
115 120 125
Met Met Lys Glu Arg Glu Ser Gln Ile Arg Glu Glu Tyr Asp His Val
130 135 140
Leu Ser Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Thr Phe Val Lys Phe Thr
145 150 155 160

Tyr Asp Gln

<210> 30
<211> 442
<212> DNA
<213> Boophilus microplus

<400> 30
atggccttgcg caacatta aa gcgaacacat gactgggacc ccttgacag tccgagtggc 60
agatcgccga agcgacgccg atgtatgcct ctgtccccgc ctctacaag ggcgcaccag 120
atcgatccct cgcccttcgg agacgtgcc acaaagttga cttcagagga gatagcagcc 180
aacatccgtg aggagatgcg acggctacaa cggcgcaagc agctctgttt ccagggcgct 240
gaccctgaat cccagcatac cagtgggtctc tgcgcaccag tgcacgcaga ccagcccttg 300
ttcacgttcc gccaggttgg gctcatttgc gaacgaatga tgaaggagcg agagagcaag 360
atacgggagg agtatgacca tgtgctatct accaaactcg cagaacagta cgacacattt 420
gtcaagttta cgtacgacca aa 442

<210> 31
<211> 147
<212> PRT
<213> Boophilus microplus

<400> 31
Met Ala Cys Ala Thr Leu Lys Arg Thr His Asp Trp Asp Pro Leu His
1 5 10 15

118
210

FuenteCIP.ST25

Ser Pro Ser Gly Arg Ser Pro Lys Arg Arg Arg Cys Met Pro Leu Ser
20 25 30

Pro Pro Pro Thr Arg Ala His Gln Ile Asp Pro Ser Pro Phe Gly Asp
35 40 45

Val Pro Pro Lys Leu Thr Ser Glu Glu Ile Ala Ala Asn Ile Arg Glu
50 55 60

Glu Met Arg Arg Leu Gln Arg Arg Lys Gln Leu Cys Phe Gln Gly Ala
65 70 75 80

Asp Pro Glu Ser Gln His Thr Ser Gly Leu Ser Ser Pro Val His Arg
85 90 95

Asp Gln Pro Leu Phe Thr Phe Arg Gln Val Gly Leu Ile Cys Glu Arg
100 105 110

Met Met Lys Glu Arg Glu Ser Lys Ile Arg Glu Glu Tyr Asp His Val
115 120 125

Leu Ser Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Thr Phe Val Lys Phe Thr
130 135 140

Tyr Asp Gln
145

<210> 32
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide primer

<400> 32
gcgtcgtgtg gagcatcagc gac

23

<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide primer

<400> 33
tcgcaacgga caacggcagg ttg

23

<210> 34
<211> 23

17A 211

FuenteCIP.ST25

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide primer

<400> 34
gcttgcgcaa cattaagcg aac 23

<210> 35
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide primer

<400> 35
tgcttggttg cagatgccca tca 23

<210> 36
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide primer

<400> 36
gaaatatctg tgaaccaag gcc 23

<210> 37
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide primer

<400> 37
attgcacaac acatcattaa ctg 23

<210> 38
<211> 486
<212> DNA
<213> Rhipicephalus appendiculatus

<400> 38
atggccttg cgcattaaa gcggacacat gactgggacc ccttgcacag tccgagtggc 60
agatcaccaa agcgacgccg atgcatgcct ctgtccccgc ctccaacgag ggcgcaccag 120
atcgatccct cgcccttcgg agacgtgccca ccaaagttga cttcagagga gatagcagcc 180
aacatccgcg aggagatgcg acggctacaa cggcgcaagc agctctgttt tcaaggcacc 240
gacgccgaat ccagcatac cagtggcttc tcgtcaccgg tgcgtcgaga ccagcccctg 300
ttcacgttcc gccaggttgg gctcatttgc gaacgcatga tgaaggagcg agagagcaag 360

120 212

FuenteCIP.ST25

atacgggagg agtatgacca cgtgctatcc accaagctcg cagaacagta cgacacgttt 420
gttaaattta cctacgacca aattcagaag cggtttgagg gtgctacgcc cagctatttg 480
tcgtaa 486

<210> 39
<211> 161
<212> PRT
<213> Rhipicephalus appendiculatus
<400> 39

Met Ala Cys Ala Thr Leu Lys Arg Thr His Asp Trp Asp Pro Leu His
1 5 10 15

Ser Pro Ser Gly Arg Ser Pro Lys Arg Arg Arg Cys Met Pro Leu Ser
20 25 30

Pro Pro Pro Thr Arg Ala His Gln Ile Asp Pro Ser Pro Phe Gly Asp
35 40 45

Val Pro Pro Lys Leu Thr Ser Glu Glu Ile Ala Ala Asn Ile Arg Glu
50 55 60

Glu Met Arg Arg Leu Gln Arg Arg Lys Gln Leu Cys Phe Gln Gly Thr
65 70 75 80

Asp Ala Glu Ser Gln His Thr Ser Gly Leu Ser Ser Pro Val Arg Arg
85 90 95

Asp Gln Pro Leu Phe Thr Phe Arg Gln Val Gly Leu Ile Cys Glu Arg
100 105 110

Met Met Lys Glu Arg Glu Ser Lys Ile Arg Glu Glu Tyr Asp His Val
115 120 125

Leu Ser Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Thr Phe Val Lys Phe Thr
130 135 140

Tyr Asp Gln Ile Gln Lys Arg Phe Glu Gly Ala Thr Pro Ser Tyr Leu
145 150 155 160

Ser

122
213

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
A TODOS CUANTOS LA PRESENTE VIEREN:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

30 de diciembre del

2005

LA PRESENTE ES PARA CERTIFICAR QUE LA ANEXA ES UNA COPIA FIEL DE LOS ARCHIVOS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AQUELLOS DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD DE PATENTE IDENTIFICADA EN LO SIGUIENTE, QUE CUMPLE CON LOS REQUERIMIENTOS PARA QUE LE SEA OTORGADA UNA FECHA DE PRESENTACION BAJO 35 USC 111.

NUMERO DE SOLICITUD: 10/972,789

FECHA DE PRESENTACION: 25 de octubre del 2004

EL CODIGO Y NUMERO DEL PAIS DE SU SOLICITUD DE PRIORIDAD, A SER UTILIZADO PARA PRESENTACION EN EL EXTRANJERO BAJO LA CONVENCION DE PARIS, ES US10/972,789

Por Poder del

Subsecretario de Comercio para la Propiedad
Intelectual y

Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los
Estados Unidos

(firmado)

(SELLO)

P. SWAIN

Funcionario que Certifica

PATENTE

Expediente No.: 57338/04-597

27 214

CERTIFICACION BAJO 37 C.F.R. Y 1.10

Por la presente certifico que, en la fecha mostrada enseguida esta correspondencia está siendo depositada con el Servicio Postal de los Estados Unidos en un sobre dirigido a: Mail Stop Patent Application, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alejandría, VA 22313-1450 como "Express Mail Post Office to Address" Etiqueta de Envío de Correo No EV166756583US el 25 de octubre del 2004.

(firmado)

LUZ C. LOPEZ

Firma

(Nombre escrito o impreso

de la persona que

certifica)

Clasificación Preliminar:

Clase Propuesta:

Subclase:

NOTA: "Todos los solicitantes son demandados para incluir una clasificación preliminar sobre las solicitudes de patente recientemente presentadas. La clasificación preliminar, de preferencia las designaciones de clase y subclase, debe ser identificada en la esquina derecha superior de la carta de transmisión que acompaña los documentos de la solicitud, por ejemplo "Clase Propuesta 2, subclase 129". M.P.E.P. Sección 601, 7ª Ed.

12/215

EN LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS

Mail Stop Patent Application

Commissioner for Patents

P.O. Box 1450

Alejandro, VA 22313-1450

NUEVA TRANSMISION DE SOLICITUD

Transmitida con la presente para presentación está la
solicitud de patente de

Inventor(es): José de Jesús DE LA FUENTE

Katherine M. TOCAN

Consuelo GARCIA-ALMAZAN

Edmour F. BLOVIN

Para(Título): ANTIGENOS Y VACUNAS PROTECTORES PARA EL
CONTROL DE INFESTACIONES POR GARRAPATAS
MULTIESPECIES

157 216

PATENTE

Expediente No.: 57338/04-597

1. Tipo de Solicitud

Esta nueva solicitud es para un(a)

- ☐ Original (no provisional)
- ☐ Diseño
- ☐ Planta
- ☐ Divisional
- ☐ Continuación
- ☒ Continuación en parte (C-I-P).

2. Beneficio de la(s) Solicitud(es) Norteamericana(s)

Previa(s) (35 U.S.C. Secciones 119(e), 120 o 121)

- ☒ La nueva solicitud que es transmitida reivindica el beneficio de la(s) solicitud(es) norteamericana(s) previa(s).

Esta solicitud es una continuación-en-parte de la solicitud correspondiente No. de Serie 10/425,563, presentada el 04/29/2003; que en parte es una no provisional de la solicitud correspondiente No. de Serie 60/376,251, presentada el 04/29/2002.

3. Documentos Adjuntos

A. Requeridos para la Fecha de Presentación bajo 37 C.F.R. Sección 1.53(b) (Regular) o 37 C.F.R. Sección 1.153 (Diseño) Solicitud

<u>36</u>	Páginas de Especificación
<u>6</u>	Páginas de Reivindicaciones
<u>1</u>	Página de Extracto
<u>4</u>	Hojas de Dibujos [Formal]

126 217

☐ El(los) dibujo(s) adjunto(s) es(son) fotografía(s),
y también se adjunta una "PETICION PARA ACEPTAR
FOTOGRAFIA(S) COMO DIBUJO(S)". 37 C.F.R. Sección
1.84(b).

☐ Formal

☐ Informal

B. Otros Documentos Adjuntos

☐ Páginas de declaración y poder del apoderado

☐ Páginas de cesión

☐ Petición de no Publicación y Certificación bajo
35 U.S.C. 122(b)(2)(B)(i)

☒ Hoja de Datos de la Solicitud Inicial (4 pg)

☐ Ninguno

☐ Otro

4. Documentos Adicionales Adjuntos

☐ Enmiendas a las reivindicaciones

☐ Cancelar en esta solicitud las
reivindicaciones ☐ antes de calcular los
derechos de presentación. (Por lo menos
una reivindicación independiente original
debe ser retenida para propósitos de
presentación).

☐ Adicionar las reivindicaciones mostradas
en la enmienda adjunta. (Las
reivindicaciones adicionadas se han
numerado consecutivamente siguiendo las
reivindicaciones originales de numeración
más alta).

127 218

0

- ☐ Enmienda Preliminar.
- ☐ Declaración de Descripción de Información (37 C.F.R. Sección 1.98)
- ☐ Forma PTO-1449 (PTO/SB/08A y 08B)
- ☐ Citas
- ☐ Declaración de Depósito Biológico
- ☒ Envío de "Listado de Secuencia", copia leíble en computadora y/o enmienda que pertenece a la misma para la invención de biotecnología que contiene secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos.
- ☒ NOTA: Por la presente declaro que la información registrada en la forma leíble en computadora es idéntica al listado de secuencia escrito (en documento o disco compacto). Ver 37 CFR 1.821(f).
- ☐ Autorización del(os) Apoderado(s) para Aceptar y Seguir Instrucciones del Representante
- ☐ Comentarios Especiales
- ☐ Otro

5. Declaración o Juramento (incluyendo poder del apoderado)

- ☐ Adjunto
- Ejecutado por
 - ☐ Inventor(es)
 - ☐ representante legal del(los) inventor(es).
- 37 C.F.R. Sección 1.42 o 1.43.
- ☐ inventor conjunto o persona que muestra un interés propietario a favor del inventor

125 219

quién rehusó firmar o no puede ser notificado.

☐ Esta es la petición requerida por 37 C.F.R. Sección 1.47 y también se adjunta la declaración requerida por 37 C.F.R. Sección 1.47. Ver el párrafo 13 enseguida para derechos.

☒ No adjunto.

☐ La solicitud es hecha por una persona autorizada bajo 37 C.F.R. 1.41 a favor de todos los inventores mencionados anteriormente.

☐ Que muestra que la presentación es autorizada.

6. Idioma

☒ Inglés

☐ No en Inglés

☐ la traducción adjunta incluye una declaración de que la traducción es precisa. 37 C.F.R. Sección 1.52(d).

7. Cesión

☒ Una cesión de la invención a

☐ se adjunta. Una

☐ "HOJA DE CUBIERTA PARA LA CESION (DOCUMENTO) QUE ACOMPAÑA LA NUEVA SOLICITUD DE PATENTE" o FORMA PTO 1595 separada también se adjunta.

☐ seguirá

☒ Cesión previamente registrada el 07/14/2003 en el carrete 014258/Cuadro 0067.

124 270

8. Copia Certificada

Copia(s) certificada(s) de la(s) solicitud(es)

País:

Solicitud No.:

Presentada:

a partir de la cual se reivindica la prioridad

[] está(n) adjunta(s)

[] seguirá.

9. Cálculo de Derechos (37 C.F.R. Sección 1.16)

A. [X] Solicitud Regular

REIVINDICACIONES COMO SE PRESENTARON

Reivindicaciones	Número	Autorización	Número	Tasa	Derechos
	Presen-	de Derechos	Extra		Básicos
	tado	Básicos			37 C.F.R.
					Sección
					1.16(a)
					\$790.00

Reivindicaciones

Totales. (37 C.F.R. 53 - 20 = 33 x \$ 18.00 594

Sección 1.16(b))

Reivindicaciones

Independientes (37 10 - 3 = x \$58.00 580.00

C.F.R. Sección

1.16(b))

221

Reivindicación(es)

Dependiente(s) x \$300.00 .00

Múltiple(s), si las

hay (37 C.F.R.

Sección 1.16(b))

☐ Se adjunta la enmienda que cancela la reivindicaciones extras.

☐ Se adjunta la enmienda que suprime las dependencias múltiples.

☐ Derechos para reivindicaciones no están siendo pagados en este momento.

Calculo de Derechos de presentación

\$2,264.00

B. ☐ Solicitud de diseño

(\$340.00-37 C.F.R. Sección 1.16(f))

Calculo de Derechos de presentación

\$

C. ☐ Solicitud de Plantas

(\$530.00-37 C.F.R. Sección 1.16(f))

Calculo de Derechos de presentación

\$

10. Declaración(es) de Entidad pequeña

13/ 222

☐ Declaración de entidad pequeña es reivindicada en este momento.

☒ Declaración de entidad pequeña no es reivindicada en este momento.

Cálculo de Derechos de Presentación (50% de A, B o C anterior)

\$2,264.00

11. Petición para Búsqueda de Tipo Internacional (37 C.F.R. Sección 1.104 (d))

(completar, si es aplicable)

☐ Por favor preparar un reporte de búsqueda de tipo internacional para esta solicitud en el momento cuando el examen nacional sobre los méritos toma lugar.

12. Pago de Derechos que es Hecho en Este Momento

☒ No adjunto

☒ Ningún derecho de presentación está siendo pagado en este momento.

☐ Adjunto

☐ Derechos de Presentación

\$ _____

☐ Cesión de registro

(\$40.00; 37 C.F.R. Sección 1.21(h))

(Ver la "HOJA DE CUBIERTA PARA LA CESION QUE ACOMPAÑA LA NUEVA SOLICITUD" Adjunta).

\$ _____

☐ Derechos de petición para presentar por otro diferente a todos los inventores o personas a favor del inventor donde el

132 223

inventor rehusó firmar o no puede ser notificado

(\$130.00; 37 C.F.R. Sección 1.47(I))

\$ _____

- ☐ Para procesamiento de una solicitud con una especificación en un idioma no en Inglés

(\$130.00; 37 C.F.R. Secciones 1.52(d) y 1.17 (k))

\$ _____

- ☐ Procesamiento y retención de derechos

(\$130.00; 37 C.F.R. Secciones 1.53(d) y 1.21 (1))

\$ _____

- ☐ Derechos para reporte de búsqueda de tipo internacional

(\$40.00; 37 C.F.R. Sección 1.21(e))

\$ _____

Derechos Totales Adjuntos

\$ _____

13. Método de Pago de los Derechos

- ☐ Cheque por la cantidad de \$ _____.

- ☐ Cargar a la Cuenta No. _____ en la cantidad de \$ _____.

☐ Se adjunta un duplicado de esta transmisión.

14. Autorización para Cargar Derechos Adicionales

- ☐ El Comisionado está por la presente autorizado para cargar los siguientes derechos adicionales

✓ 224

mediante este documento y durante la pendencia completa de esta solicitud a la Cuenta No.

- ☐ 37 C.F.R. Sección 1.16(a), (f) o (g) (derechos de presentación)
- ☐ 37 C.F.R. Sección 1.16(b), (c) y (d) (presentación de reivindicaciones extras)
- ☐ 37 C.F.R. Sección 1.16(e) (sobrecargo para presentar los derechos de presentación básicos y/o declaración en una fecha después de la fecha de presentación de la solicitud)
- ☐ 37 C.F.R. Sección 1.17(a)(1)-(5) (derechos de extensión conforme a la Sección 1.136(a)).
- ☐ 37 C.F.R. Sección 1.17 (derechos del procesamiento de la solicitud)
- ☐ 37 C.F.R. Sección 1.18 (derechos de expedición en o antes el envío de la Notificación de Autorización, conforme a 37 C.F.R. Sección 1.31(b)).

15. Instrucciones en cuanto al Sobre pago

- ☐ Cuenta de Crédito No. _____.
- ☐ Reembolso

16. Dirección de Correspondencia

No. de Cliente 22206

Respetuosamente Enviado,

10/25/04

(firmado)

FECHA

FIRMA DEL PROFESIONAL

Reg. No.: 36,050

R. Alan Weeks

13/ 225

impreso
(nombre escrito o
del profesional)

Tel. No.: (918) 599-0621
800

321 S. Boston Ave., Suite

P.O. Address

Cliente No.: 22206

Tulsa, OK 74103-3318

284086.1

137 226

HOJA DE DATOS DE LA SOLICITUD INICIAL

Información de la Solicitud

Tipo de Solicitud::	Regular
Materia Sujeto::	Utilidad
Clasificación Sugerida::	
Unidad del Grupo Técnico Sugerida::	
¿Envío de Secuencia?::	Documento
¿Forma Leíble en Computadora (CRF)?	:: Si
Número de copias de CRF::	Una
Título::	Antígenos y vacunas protectores para el control de infestaciones por garrapatas multiespecies
Número de Expediente del Apoderado::	57338/04-597
Petición para Publicación temprana::	No
Petición para no Publicación::	No
Figura de Dibujos Sugerida::	
Hojas de Dibujos Totales::	4
¿Entidad Pequeña?::	No
¿Petición Incluida?::	No
¿Orden Secreto en la Solicitud	
Original?::	No
Información del Solicitante	
Tipo de Autoridad del	
Solicitante Uno::	Inventor

22

País de Ciudadanía Primario:: Cuba
Estado:: Capacidad Completa
Nombre:: José de Jesús
Apellido:: de la Fuente
Ciudad de Residencia: Stillwater
Estado o Provincia de Residencia:: OK
País de Residencia:: EUA
Calle de dirección de correo:: 400 Squires
landing, Apt. M-5
Ciudad de dirección de correo:: Stillwater
Estado o Provincia de la
dirección de correo:: OK
País de dirección de correo:: EUA
Código postal de dirección de correo:: 74074

Tipo de Autoridad del Solicitante

Dos:: Inventor
País de Ciudadanía Primario:: EUA
Estado:: Capacidad Completa
Nombre:: Katherine M.
Apellido:: Kocan
Ciudad de Residencia: Perkins
Estado o Provincia de Residencia:: OK
País de Residencia:: EUA
Calle de dirección de correo:: 3909 E. 92nd
Street
Ciudad de dirección de correo:: Perkins
Estado o Provincia de la
dirección de correo:: OK

127X 228

País de dirección de correo:: EUA
Código postal de dirección de correo:: 74059

Tipo de Autoridad del Solicitante

Tres:: Inventor
País de Ciudadanía Primario:: México
Estado:: Capacidad Completa
Nombre:: Consuelo
Apellido:: García-Almazán
Ciudad de Residencia: Stillwater
Estado o Provincia de Residencia:: OK
País de Residencia:: EUA
Calle de dirección de correo:: 835 Connell
Ciudad de dirección de correo:: Stillwater
Estado o Provincia de la
dirección de correo:: OK
País de dirección de correo:: EUA
Código postal de dirección de correo:: 74075

Tipo de Autoridad del Solicitante

Cuatro:: Inventor
País de Ciudadanía Primario:: EUA
Estado:: Capacidad Completa
Nombre:: Edmour F.
Apellido:: Blouin
Ciudad de Residencia: Perkins
Estado o Provincia de Residencia:: OK
País de Residencia:: EUA

17/129

Calle de dirección de correo:: 3909 E. 92nd
Street
Ciudad de dirección de correo:: Perkins
Estado o Provincia de la
dirección de correo:: OK
País de dirección de correo:: EUA
Código postal de dirección de correo:: 74059

Información de Correspondencia

Correspondencia del Cliente No:: 22206

Información del Representante

Número del Cliente del Representante	22206
--------------------------------------	-------

Información de Prioridad Nacional

Solicitud:	Tipo de Continuidad::	Solicitud Original::	Presentación Original::
	Continuación en parte	10/425,563	04/29/03
10/425,563	No Provisional de	60/376,251	04/29/02

Información de Prioridad Extranjera

País::	Número de Solicitud::	Fecha de presentación::	Prioridad reivindicada::
			Si o No

174 230

Información del Cesionario

Nombre del Cesionario: The Board of Regents for
Oklahoma State University

284140.1

Inicial octubre 25 del 2004.

**ANTIGENOS Y VACUNAS PROTECTORES PARA EL CONTROL DE
INFESTACIONES POR GARRAPATAS MÚLTIESPECIES**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud es una continuación en parte de la solicitud de patente norteamericana No. de Serie 10/425,563 copendiente, presentada el 29 de abril del 2003, esta solicitud que reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional norteamericana No. de Serie 60/376,251 presentada el 29 de abril del 2002. Ambas solicitudes de prioridad anotadas son incorporadas en la presente por referencia

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo Técnico:

[0002] La presente invención se relaciona con la identificación de antígenos protectores contra infestación de garrapatas, secuencias de genes y proteínas codificadas para tales antígenos, vacunas relacionadas y métodos útiles para inducir una respuesta inmune en mamíferos, los cuales protegen contra un amplio rango de especies de garrapatas.

Antecedentes:

[0003] Las garrapatas parasitan animales salvajes, domésticos y humanos y transmiten patógenos que incluyen hongos, bacterias, virus y protozoos. Actualmente, las garrapatas se consideran segundos en el mundo después de los mosquitos como vectores de enfermedades humanas, pero se consideran como el vector más importante de patógenos en Norte América (Parola y Raoult, 2001). Las *Ixodes* spp. están distribuidas por todo el mundo y actúan como vectores de enfermedades humanas causadas por *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), *Anaplasma*

phagocytophila (erliquiosis granulocítica humana), *Coxiella burnetti* (fiebre Q), *Francisella tularensis* (tularemia), *B. afzelii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* y *B. garinii*, *Rickettsia helvetica*, *R. japonica* y *R. australis*, *Babesia divergens* y virus de encefalitis causada por las garrapatas (TBE) y fiebre hemorrágica de Omsk (Estrada-Peña y Jongejan, 1999; Parola y Raoult, 2001). A todo lo largo del este y el sudeste de Estados Unidos y Canadá, la *I. scapularis* (garrapata de patas negras) es el vector principal de *B. burgdorferi* en sentido estricto y *A. phagocytophila* (Estrada-Peña y Jongejan, 1999; Parola y Raoult, 2001). Además de la *Ixodes*, otra especie de garrapata de importancia médica y veterinaria incluye los de los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Boophilus*.

[0004] El control de la infestación de garrapatas es difícil y a veces poco práctico para garrapatas con múltiples hospederos como la *Ixodes* spp. Actualmente, el control de garrapatas se lleva a cabo por manejo integrado de plagas en el cual se adaptan diferentes métodos a un área o contra una especie de garrapata con debida consideración a los efectos ambientales. El control de garrapatas por vacunación, sin embargo, podría evitar la contaminación ambiental y la selección de garrapatas resistentes a los medicamentos que resultan de la aplicación repetida de acaricidas (de la Fuente y colaboradores, 1998; García-García y colaboradores, 1990; de la Fuente y Kocan 2004). Las vacunas contra las garrapatas también permitirían incluir múltiples antígenos para atacar un amplio rango de especies de

garrapatas y la incorporación de antígenos que bloquean patógenos (de la Fuente y Kocan 2004).

[0005] Recientemente, se han desarrollado vacunas contra la *Boophilus* spp. de un solo hospedero (Willadsen, 1997; Willadsen y Jongejan, 1999; de la Fuente y colaboradores, 1999; 2000; de Vos y colaboradores, 2001; de la Fuente y Toca, 2004). El antígeno recombinante B. microplus BM86 incluido en las formulaciones de la vacuna comercial TickGARD (Hoechst Animal Health, Australia) y Gavac (Heber Biotec S.A., Havana, Cuba), también confiere protección contra los géneros de garrapatas *Hyalomma* y *Rhipicephalus* relacionados filogenéticamente (de la Fuente y colaboradores, 2000; de Vos y colaboradores, 2001; de la Fuente y Toca, 2004). Sin embargo, la inmunización con BM86 falla en proteger contra la *Amblyomma* spp. filogenéticamente mas distante (de Vos y colaboradores, 2001). Estos resultados sugieren que usar BM86 o un gen cercanamente relacionado para la producción de vacunas contra la *Ixodes* spp. u otros géneros de garrapatas filogenéticamente distantes de la *Boophilus* spp. (Black y Piesman, 1994) sería poco práctico. Por lo tanto, permanece una necesidad de identificar candidatos de vacunas de más amplio espectro contra infestaciones de garrapatas a través de especies filogenéticamente distantes (de la Fuente y Toca, 2004).

[0006] En la solicitud de patente con número de serie 10/425,653 que da origen a esta nosotros describimos la identificación por ELI y la secuencia de análisis de clones de ADNc contra infestaciones experimentales de *I. Scapularis* en lo que fue un primer

ejemplo de la aplicación de ELI a artrópodos y particularmente a garrapatas (Almazán y colaboradores, 2003 a,b). Se creyó que estos antígenos protectores, aunque identificados para *I. Scapularis*, podían ser protectores cruzados entre la especie *Ixodes* considerando el alto grado de conservación de la secuencia de genes y la función de proteínas entre especies del mismo género.

[0007] Sorprendentemente, se ha descubierto que ciertos antígenos protectores exhiben actividad y son expresados a través de especies de garrapatas, y en algunas circunstancias a través de géneros, lo que hace posible el uso de antígenos comunes en un amplio rango de formulaciones de vacunas contra garrapatas.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

[0008] En la solicitud que da origen a esta, se identificaron numerosos antígenos protectores derivados de la *I. Scapularis* y demostraron poseer propiedades protectoras contra infestaciones de garrapatas de *I. Scapularis*. Entre estos antígenos había clones y polipéptidos asociados designados 4D8, 4F8 y 4E6. Aquí se demuestra que la actividad de estos antígenos protectores particulares se extiende a otras especies de garrapatas, en el caso del 4D8, 4F8, y 4E6 a otras especies de garrapatas que no son *Ixodes*. Además, se proporcionan las secuencias recientemente descubiertas (ADN y proteína) del antígeno protector contra garrapatas 4D8 derivado del género *Rhipicephalus*, particularmente *Rhipicephalus appendiculatus*.

[0009] Se analizaron la conservación de la secuencia y la expresión de 4F8, 4D8 y 4E6 en las especies

144 235

relacionadas al *I. scapularis*, *I. pacificus* y *I. ricinus*, y en *D. variabilis*, *R. sanguineus* y *A. americanum* por RT-PCR usando los cebadores o iniciadores específicos para las secuencias conocidas de *I. scapularis*. La expresión se detectó en *I. ricinus* para todos los tres genes y en *I. pacificus* para el 4D8 y 4E6. La expresión de 4D8 también se detectó en *D. variabilis*, *B. microphilus*, *R. sanguineus* y *A. americanum*. Se clonaron y secuenciaron los genes correspondientes al 4D8 en *D. variabilis*, *A. americanum* y *B. microplus*.

[0010] La detección de la expresión de 4D8 y 4E6 en especies de garrapatas no *Ixodes* fue la base para un experimento en el que se inmunizaron conejos con 4F8, 4D8 y 4E6 derivados de la *I. scapularis* y probados con ninfas de *I. scapularis*, *D. variabilis* y *A. americanum*. Los resultados sustentan la inventiva de los antígenos protectores en formulaciones de vacunas para el control de múltiples especies de garrapatas.

[0011] En concordancia, en una modalidad de la presente invención se proporcionan secuencias de ADNc, fragmentos codificadores de proteínas de los mismos, y secuencias de proteínas derivadas para los antígenos protectores contra múltiples especies denominados 4F8, 4D8 y 4E6.

[0012] En otra modalidad de la presente invención se proporciona una composición de vacuna que comprende las proteínas recombinantes protectoras y/o ADNc modificados por separado o los cuales pueden ser opcionalmente combinados con un ayudante para mejorar la eficacia de la protección de preparaciones de vacunas contra múltiples

especies de garrapatas, en donde la composición de las vacunas comprende además un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición de la vacuna también puede ser opcionalmente combinada con componentes patógenos originados por las garrapatas para proporcionar un medio para controlar infecciones originadas por las garrapatas, en donde la composición de la vacuna comprende además un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y un ayudante.

[0013] En otra modalidad de la presente invención se proporciona un método para inducir una respuesta inmune en un mamífero para proporcionar protección inmune, lo cual reduce o afecta las infestaciones por las garrapatas objetivo y/o la transmisión de patógenos originados por las garrapatas, el método comprende administrar a una población humana y a una reserva mamífera en riesgo una cantidad efectiva de una vacuna que comprende las proteínas recombinantes protectoras y/o ADNc modificados solo o en combinación con un ayudante o componentes de un patógeno originado por garrapatas para proporcionar medios para controlar infestaciones de garrapatas y para reducir la transmisión a humanos de infecciones originadas por garrapatas, en donde la composición de la vacuna comprende además un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0014] Un mejor entendimiento de la presente invención y sus objetivos y ventajas será aparente para aquel con habilidad en el arte a partir de la siguiente descripción detallada, en donde se describen solo las modalidades preferidas de la invención, simplemente a

14/10 237

modo de ilustración del mejor modo contemplado para llevar acabo la invención. Como se llegará a entender, la invención es capaz de modificaciones en varios aspectos obvios, todos sin alejarse del alcance y espíritu de la invención. En concordancia, la descripción solo debe considerarse como de naturaleza ilustrativa y no restrictiva.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0015] La FIGURA 1 es un resumen del acercamiento ELI al ADNc utilizado para identificar antígenos protectores contra la infestación de *I. Scapularis*.

[0016] La FIGURA 2A es un gráfico que muestra los resultados de la selección primaria de los conjuntos de ADNc (A - H 1 - 4, A5) por ELI. V, ratones de control inyectados con 1 μ g del vector de ADN solo. $*\alpha < 0.01$, $**\alpha < 0.05$ (Prueba post-hoc de Tukey para comparaciones apareadas después de ANOVA). Los números en las casillas representan valores para la inhibición de la infestación de garrapatas respecto al grupo de control.

[0017] La FIGURA 2B es una gráfica que muestra los resultados de la selección primaria de los conjuntos de ADNc (A6-A10, B-H 5-8) por ELI. V, ratones de control inyectados con 1 μ g del vector de ADN solo. $*\alpha < 0.01$, $**\alpha < 0.05$ (Prueba post-hoc de Tukey para comparaciones apareadas después de ANOVA). Los números en las casillas representan valores para la inhibición de la infestación de garrapatas respecto al grupo de control.

[0018] la FIGURA 3 es una gráfica de los resultados de una selección terciaria por ELI de los subconjuntos de ADNc formados de acuerdo con la función predicha de las

proteínas codificadas. Solamente se muestran los grupos con $I \geq 15\%$ (barras blancas). El número de larvas engordadas por ratón se expresa como la media $\pm$ DE (barras negras). Los ratones de control fueron inyectados con ADNc mitocondrial (MT). * $P \leq 0.05$ (Prueba de la t de Student)

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0019] Antes de explicar la presente invención en detalle, es importante entender que la invención no se limita en su aplicación a los detalles de la construcción ilustrada en los pasos aquí descritos. La invención es capaz de otras modalidades y de ser practicada o llevada a cabo en una variedad de formas. Debe entenderse que la fraseología y la terminología empleadas aquí son para propósitos de descripción y no de limitación.

[0020] En la solicitud que da origen a ésta, se proporcionaron 25 secuencias separadas y distintas que comprendían 14 moléculas de ADNc clonadas y 11 secuencias de aminoácidos deducidas de polipéptidos codificados, dichas secuencias han sido aisladas e identificadas como protectoras contra *I. scapularis* de acuerdo con la siguiente metodología experimental descrita.

Ejemplo 1: Construcción de una librería de ADNc del I. scapularis y tamizado de antígenos protectores por ELI.

Células de garrapata

[0020] Monocapas de células IDE8 (ATCC CRL 1973), derivadas originalmente de *I. scapularis* embrionarias, se mantuvieron a 31°C en medio L-15B suplido con 5% de suero fetal bovino, caldo de triptosa de fosfato y concentrado

de lipoproteína bovina de acuerdo con Munderloh y colaboradores (1994). Las células fueron subcultivadas en subcultivos a 1:5 - 1:10 cuando las monocapas alcanzaron una densidad de aproximadamente 10^7 células/frasco T-25. El medio se reemplazó semanalmente.

Construcción de la librería

[0022] Se construyó una librería de expresión de ADNc en el vector pEXP1 que contenía el promotor del fuerte citomegalovirus CMV_{IE} (Clontech). Como planeábamos atacar las etapas larvales tempranas de *I. scapularis*, escogimos construir nuestra librería a partir de poli(A)+ ARN derivado de cultivos de células IDE8 embrionarias de *I. scapularis*. La librería de ADNc contenía 4.4×10^6 clones independientes en una concentración determinada por titulación de aproximadamente 10^6 cfu/ml con más del 93% de los clones con insertos de ADNc. El tamaño promedio del ADNc fue de 1.7 kb (0.54 a 4.0 kb).

Selección primaria

[0023] El esquema general para la identificación de antígenos protectores por medio de ELI, fraccionamiento secuencial y análisis de secuencia se muestra en la figura 1.

[0024] Se prepararon noventa y seis placas IBA (maestras) que contenían un promedio de 41 (30 - 61) clones de ADNc por placa. Se hicieron réplicas de cada placa y los clones de cada placa fueron agrupados, inoculados en Luria-Bertani con 50 μ g/ml de ampicilina, crecidos por 2 horas en una placa de 96 cubetas y el DNA de plásmido se purificó de cada conjunto (sistema de purificación de DNA de plásmido Wizard SV 96, promega,

11/11/200

Madison, WI, Estados Unidos de América). Se utilizaron ratones hembra BALB/c, de 5 - 6 semanas de edad al momento de la primera vacunación. Los ratones se cuidaron de acuerdo con los estándares establecidos en la Guía para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio. Los ratones fueron inyectados con una jeringa tuberculina de 1 ml y una aguja de calibre 27 a los días 0 y 14. Se inmunizaron IM tres ratones por grupo en el muslo con 1 µg de ADN/dosis en 50 µl de PBS. Se incluyeron dos grupos de tres ratones cada uno como control. Un grupo se inyectó solamente con 1 mg de ADN vectorial y el segundo solamente con solución salina. Dos semanas después de la última inmunización, los ratones fueron infestados con 100 larvas de *I. scapularis* por ratón. Las garrapatas se criaron artificialmente en las instalaciones de crianza de garrapatas de la Universidad de Oklahoma alimentando larvas en ratones, ninfas en conejos y adultos en ovejas y utilizando para la infestación en nuestros experimentos las larvas obtenidas de los huevos puestos por una sola hembra. Doce horas después de la infestación de garrapatas, se contaron las larvas que no se sujetaron para calcular el número de larvas unidas por ratón y los ratones se transfirieron a jaulas nuevas. Se recogieron diariamente las larvas repletas que caían de cada ratón y se contaron por 7 días. La inhibición de la infestación de garrapatas (I) para cada grupo se calculó respecto a los controles inmunizados con el vector como [1 - ($\frac{n}{c} \times \frac{ic}{in}$)] x 100, en donde n es el número promedio de larvas repletas recuperadas por ratón de cada grupo de prueba, c es el número

X/D 241

promedio de larvas repletas recuperadas por ratón del grupo de control, $\langle RL \rangle_{ic}$ es el número promedio de larvas unidas por ratón para el grupo de control, y $\langle IR \rangle_{in}$ es el número promedio de larvas unidas por ratón para cada grupo de prueba.

[0025] Los conjuntos de 41 (30 - 61) clones de ADNc de *I. scapularis* se seleccionaron por ELI. Solamente se analizaron 33 conjuntos de ADNc por experimento. El nivel de infestación promedio de garrapatas fue de 50 ± 31 y 56 ± 15 y 54 ± 18 larvas/ratón para los ratones inmunizados con ADNc y los controles, respectivamente ($P > 0.05$) (Tabla 1). El número promedio de larvas engordadas recuperadas por ratón fue de 9 ± 3 y 13 ± 4 en los ratones inmunizados con ADNc y 16 ± 4 y 17 ± 3 en el grupo de control inmunizado con vector ($P < 0.05$) (Tabla 1). No se observó una reducción en el número de larvas recogidas de los ratones que recibieron el ADN vectorial en comparación con los controles inmunizados con solución salina. El número máximo de larvas engordadas se recogió 3 a 4 días después de la infestación. Sin embargo, en los ratones inmunizados con los conjuntos de ADNc B5, A8 y A10 (Figura 2) se registró un retardo en el desarrollo de la larva en 1 o 2 días. La inhibición promedio de la infestación de garrapatas (I) fue de $49 \pm 28\%$ y $30 \pm 22\%$ (Tabla 1). Después de dos experimentos que cubrían el análisis de los 66 conjuntos (2705 clones), se seleccionaron 9 conjuntos protectores (351 clones) que producían una inhibición de la infestación de garrapatas $I \geq 60\%$ (Figura 2A y 2B y la Tabla 1). Cuando comenzamos estos experimentos, planeamos seleccionar más de 4000

clones de ADNc considerando la complejidad del genoma de la garrapata. Sin embargo, para nuestra sorpresa se identificaron 9 conjuntos de ADNc protector después de la selección de 66 conjuntos que contenían más de 2705 clones de ADNc. El resultado probablemente refleja la posibilidad de interferir con infestaciones de garrapatas en muchos niveles diferentes que involucran una pléyade de productos genéticos. Los resultados de la vacunación contra las garrapatas empleando antígenos recombinantes sustentan esta visión (revisados por Mulenga y colaboradores, 2000). Debido a la complejidad del procedimiento de selección en ratones vacunados y probados con larvas de garrapatas, era difícil trabajar con más de 9 conjuntos de ADNc protector. por lo tanto no continuamos seleccionando nuevos conjuntos de ADNc y enfocamos nuestra atención en los nueve conjuntos seleccionados después de la selección primaria.

Selección secundaria

[0026] La selección secundaria se realizó para verificar la capacidad protectora de los conjuntos de ADNc seleccionados después de la selección primaria (Figura 2A y 2B). Después de la selección primaria de 66 conjuntos de ADNc (2705 clones) se seleccionaron 9 conjuntos con $I \geq 60\%$ para esta selección secundaria (reselección) empleando 5 ratones por grupo como se describe arriba. Las larvas engordadas se dejaron para que cambiaran de piel en una atmósfera con humedad del 95%. El cambio de piel de las larvas engordadas fue evaluado por examen visual de las ninfas de garrapata bajo un estereomicroscopio 34 días después de la última

7263

recolección de larvas. La inhibición del cambio de piel (M) para cada grupo se calculó respecto a los controles inmunizados con el vector como $[1 - (MLn/MLc \times RLc/RLn)] \times 100$ donde MLn es el número de ninfas para cada grupo de prueba, MLc es el número de ninfas para el grupo de control, RLc es el número de larvas recuperadas para el grupo de control, y RLn es el número de larvas recuperadas para cada grupo de prueba. Los ratones de control se inmunizaron solamente con un conjunto negativo (I = 0%) de solución salina. Un grupo fue incluido SC inmunizado con dos dosis de 100 µg de proteínas de células IDE8 de garrapata por dosis en el ayudante incompleto de Freund.

[0027] Todos los 9 conjuntos de ADNc dieron resultados positivos en la selección secundaria (no se muestran los datos). los niveles de infestación de garrapatas fueron más altos en este experimento (promedio 85 ± 6 y 84 ± 3 larvas/ratón para ratones inmunizados con ADNc y de control, respectivamente; $P > 0.05$). Sin embargo, el número promedio de larvas engordadas recuperadas por ratón fue de 39 ± 7 y 26 ± 6 para los ratones de control e inmunizados con ADNc, respectivamente ($P < 0.05$). El grupo inmunizado con células IDE8 totales de garrapata se protegieron con I = 33%. Nuevamente, no se observó una reducción en el número de larvas recogidas de los ratones que recibieron el conjunto negativo de control de ADNc (conjunto negativo F2 después de la selección primaria; Figura 2A) en comparación con los controles inmunizados con solución salina.

[0028] En la selección secundaria, el cambio de piel de las larvas engordadas se evaluó después de 34 días. El cambio de piel fue afectado en todos los grupos de prueba inmunizados con ADNc salvo uno. La inhibición del cambio de piel en los ratones de prueba inmunizados con ADNc en comparación con el grupo de control inmunizado con ADNc varió de 0% a 12% ($6 \pm 4\%$). La inhibición del cambio de piel fue mayor al 50% solamente en las larvas recogidas de ratones inmunizados con los conjuntos de ADNc B5 y A10, los cuales demostraron un retraso en el desarrollo de la larva en 1 o 2 días en la selección primaria. No se observaron diferencias entre los ratones de control inmunizados con ADNc y solución salina. Entre las larvas que no cambiaron de piel a ninfas, algunas estaban visiblemente dañadas y presentaban una fuerte coloración roja. El porcentaje de larvas en los ratones inmunizados con ADNc varió entre 3% a 18% ($7 \pm 5\%$) mientras que en los grupos de control inmunizados con solución salina y ADNc las larvas rojas representaron el 6% y el 4%, respectivamente.

Selección terciaria.

[0029] Para la selección terciaria, se agruparon 64 clones en 16 subconjuntos cada uno con 1 a 17 plásmidos de acuerdo con la función predicha de las proteínas codificadas (por ejemplo todos los plásmidos que codificaron proteínas de histona se agruparon juntos) y se utilizaron con 4 subconjuntos que contenían 182 clones de función desconocida o consecuencias sin homología a las bases de datos de secuencias para inmunizar 4 ratones por grupo. Los ratones se

1-7-2 245

inmunizaron con 0.3 μ g/plásmido/dosis en PBS de 50 μ l y se evaluaron como se describe arriba. Los ratones de control se inmunizaron con un conjunto de 20 plásmidos que contenían ADNc mitocondriales.

[0030] Los niveles de infestación de garrapatas fueron similares en todos los grupos de prueba (72 ± 2 larvas/ratón) y en los ratones de control (69 ± 2 larvas/ratón). El número de larvas engordadas recuperadas por ratón también fue similar entre los ratones de prueba (16 ± 7) y los de control (14 ± 6) ($P < 0.05$). Sin embargo, los grupos inmunizados con los subconjuntos de ADNc que contenían clones con endopeptidasa putativa, nucleotidasa, proteínas ribosomales, proteínas de choque térmico, proteínas ricas en glutamina-alanina y 3 de los subconjuntos con función desconocida o secuencias sin homología a las bases de datos de secuencias tenían $I \approx 15\%$ (Figura 3). Más aun, entre ellos, los grupos inmunizados con subconjuntos que contenían clones con endopeptidasa, nucleotidasa putativas y dos de los subconjuntos de ADNc con función desconocida o consecuencias sin homología a las bases de datos de secuencias resultaron en un niveles de infestación inferiores comparados con los ratones de control ($P \leq 0.05$) y $I \approx 40\%$ (Figura 3.) Se seleccionaron los clones homólogos a las proteínas del corión, receptores de vitelogenina, y proteínas de reconocimiento de peptidoglucanos por su capacidad de protección potencial en otras etapas del desarrollo de la garrapata.

157 206

Análisis estadístico

[0031] El número de larvas unidas por ratón y el número de larvas engordadas por ratón 7 días después de la infestación se compararon por Análisis de Varianza (ANOVA) seguido después por una serie de pruebas post hoc de Tukey para comparaciones apareadas entre ratones inmunizados con ADNc y ratones de control inmunizados con ADN vectorial (selección primaria), y por la prueba de la t de Student entre ratones inmunizados con conjuntos de ADNc positivo y los conjuntos de F2 ADNc negativos (selección secundaria) o entre ratones de prueba inmunizados con subconjuntos de ADNc y ratones inmunizados con ADNc mitocondriales (selección terciaria).

Ejemplo 2: Análisis de la secuencia para clones protectores

[0032] Todos los 351 clones de ADNc en los 9 conjuntos que resultaron positivos en la selección secundaria fueron secuenciados. El ADN de clones individuales de estos conjuntos fue purificado (sistema de purificación de ADN plásmido Wizard SV 96, Promega) de la placa maestra y parcialmente secuenciados. En la mayoría de los casos se obtuvo una secuencia de más de 700 nucleótidos. Las secuencias de nucleótidos se analizaron usando el programa AlignX (Vector NTI Suite V 5.5, InforMax, North Bethesda, MD, Estados Unidos de América). Se utilizó BLAST (Altschul y colaboradores, 1990) para buscar en las bases de datos NCBI para identificar secuencias clonadas anteriormente que pueden tener homología con aquellas que nosotros habíamos secuenciado.

152 247

El análisis de las secuencias permite agrupar los clones de acuerdo con la identidad de la secuencia a las bases de datos de ADN y predecir la función de la proteína. Los clones protectores que se seleccionaron después de la selección terciaria fueron secuenciados completamente..

[0033] La comparación a las bases de datos de secuencias permitió identificar genes reportados previamente con función conocida en 152 (43%) de los clones (Tabla 2). El cincuenta y siete por ciento de las secuencias eran homólogas a genes con función desconocida o no tenían identidad significativa a secuencias reportadas previamente (Tabla 2). De los clones con identidad de secuencia a genes con función conocida, 85% eran homólogos a 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 garrapatas Ixodid. Treinta por ciento de los clones se eliminaron de análisis posterior en base a la identidad de su secuencia, incluyendo aquellos que contenían secuencias similares (Tabla 2). Los clones protectores incluían antígenos homólogos a endopeptidasas, nucleotidasas, proteínas del corión, receptores de vitelogenina, proteínas de reconocimiento de peptidoglicano, proteínas ricas en glutamina-alanina, proteínas ribosomales y proteínas de choque térmico.

Resumen de los resultados

[0034] Los resultados obtenidos con los diferentes clones protectores identificados en el listado de la secuencia, junto con ciertas proteínas expresadas seleccionadas, se resumen en la Tabla 4.

177 268

[0035] SEQ ID NO:1 denota el clon designado 4E6, en donde el fragmento codificador de proteína relevante ha sido identificado como que comprende los residuos 1 - 117, con el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2.

[0036] SEQ ID NO:3 denota el clon designado 4D8, en donde el fragmento codificador de proteína relevante ha sido identificado como que comprende los residuos 80 - 575, los cuales codifican el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:4.

[0037] SEQ ID NO:5 denota el clon designado 4F8, en donde el fragmento codificador de proteína relevante ha sido identificado como que comprende los residuos 1 - 951, los cuales codifican el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:6.

[0038] SEQ ID NO:7 denota el clon designado 4G11, en donde el fragmento codificador de proteína relevante ha sido identificado como que comprende los residuos 1 - 967, los cuales codifican el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:8.

[0039] SEQ ID NO:9 denota el clon designado 4D6, en donde el fragmento codificador de proteína relevante ha sido identificado como que comprende los residuos 198 - 1025, los cuales codifican el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:10.

[0040] SEQ ID NO:11 denota el clon designado 3E1, en donde el fragmento codificador de proteína relevante ha sido identificado como que comprende los residuos 3 - 578, los cuales codifican el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:12.

Handwritten signature and number 249.

[0041] SEQ ID NO:13 denota el clon designado 1C10, en donde el fragmento codificador de proteína relevante ha sido identificado como que comprende los residuos 1 - 1119, los cuales codifican el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:14.

[0042] SEQ ID NO:15 denota el clon designado 3E10, en donde el fragmento codificador de proteína relevante ha sido identificado como que comprende los residuos 51 - 1544, los cuales codifican el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:16.

[0043] SEQ ID NO:17 denota el clon designado 4F11, en donde el fragmento codificador de proteína relevante ha sido identificado como que comprende los residuos 31 - 2295, los cuales codifican el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:18.

[0044] SEQ ID NO:19 denota el clon designado 3C12, en donde el fragmento codificador de proteína relevante ha sido identificado como que comprende los residuos 6 - 332, los cuales codifican el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:20.

[0045] SEQ ID NO:21 denota el clon designado 2C12, en donde el fragmento codificador de proteína relevante ha sido identificado como que comprende los residuos 3 - 137, los cuales codifican el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:22.

[0046] SEQ ID NO:22, 23 Y 24 denotan respectivamente los clones designados 1A9, 1B2 y 4A4, donde cada uno comprende una secuencia sin un polipéptido asociado.

[0047] Ahora se ha descubierto que ciertos de los antígenos protectores exhiben actividad y se expresan en

garrapatas a través de las especies, y en ciertas circunstancias a través de los géneros, haciendo posible así el uso de antígenos comunes en formulaciones de vacunas contra garrapatas de amplio espectro.

Ejemplo 3: Extensión de antígenos protectores de *I. scapularis* a otras especies de garrapatas

Métodos

Extracción de ARN y transcripción revertida (RT)-PCR

[0048] El ARN total se extrajo de los intestinos y las glándulas salivales disectadas de 30 hembras de *I. scapularis* sin alimentar, aproximadamente 100 y 1000 ninfas y larvas de *I. scapularis*, respectivamente, la masa de huevos depositados por una hembra de *I. scapularis*, glándulas salivales disectadas de 10 machos *D. variabilis*, glándulas salivales e intestinos disectados de 20 adultos de *A. americanum* y *R. sanguineus*, 10 adultos *B. microplus* y 10 hembras *I. pacificus*, respectivamente y 100 - 150 larvas de *I. ricinus*. El ARN total se extrajo de muestras de garrapatas homogenizadas usando Reactivo TRI (Sigma), excepto para el ARN de *I. ricinus* y *B. microplus* el cual se extrajo usando el Kit ARN Istapur (Eurogentec, Searing, Bélgica) y el kit Rneasy (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos de América), respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pelletilla de ARN final fue resuspendida en 50 - 100 μ l de agua estéril desionizada, tratada con dietil polícarbonato. Las reacciones RT-PCR se realizaron usando el acceso al sistema RT-PCR (Promega, madison, WI, Estados Unidos de América). Un μ L de ARN se transcribo de manera reversa

160 251

en 50 μ L de una mezcla de reacción (1.5 mM de $MgSO_4$, virus 1X de mieloblastosis aviaria (AMV) amortiguador de reacción RT/*Thermus flavus* (Tfl), 10 mM de hexamero aleatorio, 0.2 mM de cada trifosfato deoxinucleósido (fNTP), 5U AMV RT, 5u Tfl DNA polimerasa (Promega), 10 pmol de cada iniciador) a 48 °C por 45 minutos. Después de 2 minutos de incubación a 94°C, se realizó PCR en la misma mezcla de reacción con iniciadores específicos y condiciones de amplificación (tabla 5). Las reacciones de control se realizaron utilizando los mismos procedimientos pero sin control RT para contaminación de ADN en las preparaciones de ARN y sin agregar ARN para controlar la contaminación de la reacción de PCR. Se realizaron controles positivos de la reacción PCR con DNA de plásmido que contenía un ADNc de garrapata clonado y con ADN del genoma extraído de células IDE 8 de *I. scapularis*. A los productos del PCR se les realizó electroforesis en geles de azarosa al 1% para revisar el tamaño de los fragmentos amplificados por comparación con el marcador de peso molecular del ADN (1 Kb Plus DNA Ladder, Promega).

Clonación y secuenciamiento del 4D8 de D. variabilis, A. americanum y B. microplus.

[0049] Los fragmentos del ADNc 4D8 de *D. variabilis*, *A. americanum* y *B. microplus* se amplificaron por RT-PCR y se clonaron en pGEM-t (Promega). Se secuenciaron cuatro clones de cada uno en la Instalación de Secuenciamiento de Núcleos, departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Investigación Noble, Oklahoma State University.

10/252

Vacunación de conejos y prueba con ninfas de *I. scapularis*, *D. variabilis* y *A. americanum*

[0050] Se diseñó un experimento para evaluar el efecto de los antígenos protectores contra garrapatas en las etapas de ninfa de *I. scapularis*, *D. variabilis* y *A. americanum*. Un conejo blanco de Nueva Zelanda por grupo se inmunizó con tres dosis (semanas 0, 4 y 7) que contenían 50 µg/dosis de proteínas 4F8 y 4D8 purificadas o péptido sintético 4E6 derivado de *I. scapularis*, una combinación de 4F8+4D8+4E6 o albúmina de suero bovino (Sigma) como control en FIA (Sigma). Los animales se cuidaron de acuerdo con los estándares especificados en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Los conejos fueron inyectados subcutáneamente con 500 µl/dosis usando una jeringa de tuberculina de 1 ml y una aguja de calibre 27½. Dos semanas después de la última inmunización, los conejos fueron infestados con 100 ninfas de *I. scapularis* por conejo en una oreja y 110 ninfas de *D. variabilis* y *A. americanum* en la otra oreja. El número de ninfas unidas se registró y las ninfas engordadas que caían de cada oreja del conejo se recogieron diariamente y se contaron por 7 días. La ninfas engordadas de *D. variabilis* y *A. americanum* se separaron bajo la luz de un microscopio de disección. Las ninfas engordadas recogidas después de completar al periodo de alimentación se contaron y pesaron. La inhibición de la infestación de ninfas de garrapatas se calculó respecto al grupo de control como se describe previamente para la infestación de larvas de garrapata (Almazán y colaboradores, 2003). La reducción en el peso

162 253

de las ninfas engordadas se determinó en grupos experimentales respecto a las ninfas recolectadas del grupo de control.

Resultados

Expresión de ADNc protectores

[0051] La expresión de genes que codificaban los antígenos protectores contra garrapatas se analizó en los niveles de mRNA y proteína por RT-PCR e inmunobioquímica, respectivamente. La expresión de mRNA de 4F8, 4D8 y 4E6 se detectó en todas las etapas del desarrollo de *I. scapularis* y en los intestinos y las glándulas de garrapatas adultas (Tabla 6). Las reacciones de control descartaron la contaminación con ADN del genoma o durante el PCR. Además, el PCR del ADN del genoma de la garrapata mostró que el tamaño de los fragmentos amplificados de ADN era mayor al tamaño de los fragmentos de ADNc, probablemente debido a la presencia de secuencias de intrón en los genes analizados (Tabla 6).

[0052] La conservación de la secuencia y la expresión de 4F8, 4D8 y 4E6 se analizó en especies relacionadas a la *I. scapularis*, *I. pacificus* e *I. ricinus*, y en *D. variabilis*, *R. sanguineus*, *B. microplus* y *A. Americanum* por RT-PCR (tabla 6) usando los iniciadores derivados de las secuencias de *I. scapularis* (Tabla 5). La expresión se detectó en *I. ricinus* para todos los tres genes y en *I. pacificus* para 4D8 y 4E6. La expresión de 4D8 también se detectó en *D. variabilis*, *B. microplus*, *R. sanguineus* y *A. americanum*.
Secuencia de 4D8 de *D. variabilis*, *A. americanum* y *B. microplus*.

167 254

[0053] Las secuencias de los ADNc de 4D8 de *D. variabilis*, *A. americanum* y *B. microplus* y sus secuencias de aminoácidos deducidas se proporcionan en SEQ ID NOS: 26 - 31. Las secuencias asociadas con el antígeno protector contra garrapatas asociado con el antígeno protector 4D8 derivado de la *Rhipicephalus appendiculatus* se proporciona en SEQ ID NOS: 38 - 39.

Propiedades protectoras de los antígenos de garrapata contra la infestación de ninfas de *I. scapularis*, *D. variabilis* y *A. americanum*.

[0054] La detección de la expresión de 4D8 y 4E6 en especies de garrapatas diferentes a la *Ixoda* fue la base para el experimento en el cuales conejos se inmunizaron con antígenos protectores derivados de *I. scapularis* y se probaron con larvas de *I. scapularis*, *D. variabilis* y *A. americanum*. Los resultados sugieren un efecto de la inmunización con 4D8 sobre la inhibición de las infestaciones de ninfas en todas las tres especies de garrapatas y un efecto notable sobre las ninfas de *D. variabilis* reflejado en el número de garrapatas visiblemente dañadas y en la reducción del peso de las ninfas engordadas (Tabla 7). La inmunización con 4F8 tuvo un efecto solamente sobre las infestaciones de ninfas de *I. scapularis* y el efecto de la inmunización con 4E6 se reflejó en las infestaciones de *A. americanum* y en el peso de las ninfas engordadas de *D. variabilis* (Tabla 7). El efecto sinérgico de la inmunización con todos los tres antígenos se observó para el 4D8 en las ninfas de *I. scapularis* (Tabla 7).

164 255

[0055] El experimento 3, entonces, demuestra la sorpresiva utilidad de usar los antígenos protectivos contra garrapatas 4D8, 4F8 y 4E6 de la *I. scapularis* en formulaciones de vacunas para el control de múltiples especies de garrapatas.

[0056] Por lo tanto, la presente invención se relaciona con la identificación de estos antígenos los cuales protegen contra un amplio espectro de especies de garrapatas, secuencias de genes y proteínas codificadas para dichos antígenos, vacunas relacionadas y métodos útiles para inducir una respuesta inmune. más generalmente, la invención concierne a las secuencias de ADNc dadas y cualquier secuencia de nucleótidos que sea capaz de producir un anticuerpo u otra respuesta inmune (por ejemplo respuesta de las células T del sistema inmune) que reconozca un epítipo de la secuencia de aminoácidos mostrada en el Listado de Secuencia, incluyendo menos de una secuencia de ADNc completa o mutantes del mismo. por lo tanto la secuencia de nucleótidos puede codificar una proteína que es la totalidad del antígeno por la variedad de bases definidas, o un fragmento o derivado del antígeno o un producto de la fusión del antígeno o fragmento y otra proteína, con la condición que la proteína que se produce de tal secuencia es capaz de generar un anticuerpo u otra respuesta inmune que reconoce un epítipo de las secuencias de aminoácidos dadas.

[0057] Como resultado, la invención abarca secuencias de ADN que codifican y/o expresan en las células transformadas apropiadas, proteínas que pueden

167 256

ser la longitud completa del antígeno, fragmentos del antígeno, derivados del antígeno o el producto de la fusión de tal antígeno, fragmentos de antígeno o derivados de antígeno con otra proteína.

[0058] Como podrá ser apreciado por aquellos de habilidad ordinaria en el arte, una secuencia de nucleótidos que codifica los antígenos de la invención o variantes de los mismos puede diferir de las secuencias nativas aquí presentadas debido a degeneraciones del codón, polimorfismos del nucleótido, o sustituciones, eliminaciones o inserciones de nucleótidos. Mientras que se muestran varias modalidades de tales moléculas en el Listado de Secuencia, debe entenderse que dentro del contexto de la presente invención, la referencia a una o más de estas moléculas incluye variantes que ocurren naturalmente y/o secuencias sintéticas que son sustancialmente similares a las secuencias aquí proporcionadas, y, donde sea apropiado, la proteína (incluyendo péptidos y polipéptidos) que se codifica por estas secuencias y sus variantes. Como se utiliza aquí, la secuencia de nucleótidos se considera como "sustancialmente similar" si: (a) la secuencia de nucleótidos se deriva de la región de codificación de un gen nativo de las diferentes especies de garrapatas anotadas y codifica un péptido o polipéptido que posee la antigenicidad descrita (incluyendo, por ejemplo, porciones de la secuencia o variaciones alélicas de las secuencias proporcionadas); o (b) las secuencias de nucleótidos se degeneran (en otras palabras codifican el mismo aminoácido utilizando una secuencia de codones

166 257

diferente) como resultado del código genético de la secuencia de nucleótidos definida en (a); o (c) la secuencia de nucleótidos es al menos 95% idéntica a la secuencia de nucleótidos aquí provista, o (d) es un complemento de cualquiera de las secuencias descritas en (a - c).

[0059] Las proteínas incluidas dentro de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos mostrada en el Listado de Secuencia y los homólogos del mismo. Otras proteínas incluidas consisten de un fragmento de dicha secuencia capaz de generar un anticuerpo u otra respuesta inmune la cual reconoce un epítope de una secuencia de aminoácidos mostrada y un mutante de dicha secuencia capaz de generar un anticuerpo u otra respuesta inmune que reconoce un epítope de tales secuencias de aminoácidos. respecto a la homología a la secuencia nativa, una variante deberá preferiblemente tener al menos 95% de homología con la secuencia de aminoácidos. Como se utiliza aquí, la "homología" de aminoácidos se determina por un algoritmo de computador incorporado en un programa de búsqueda de una base de datos comúnmente utilizado en el arte, por ejemplo, como se incorpora en los programas BLAST (BLAST TM, un programa de computador) (Altschul y colaboradores, Nucleotid Acids res. (25) 3389 - 3402, 1997) o DNA STAR MEGALIGN (DNA STAR MEGALIGN TM, un programa de computador) que devuelve resultados similares en cálculos homólogos.

[0060] Las secuencias de nucleótidos pueden insertarse en cualquiera de un amplio arreglo de vectores de expresión por una variedad de procedimientos. tales

16X 258

procedimientos y otros se considerarán conocidos por aquellos con habilidad en el arte. Vectores apropiados incluyen secuencias de ADN cromosomal, no cromosomal, y sintéticas; por ejemplo, derivados de SV40, plásmido bacteriales, ADN de fagos; plasmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos; ADN viral tal como baculovirus, vaccinia, virus de varicela, pseudorrabia, etc. La secuencia de ADN apropiada debe ser unido operativamente en el vector a una secuencia de control de expresión (promotor) para dirigir la síntesis de mRNA. Como ejemplos representativos de tales promotores, se pueden mencionar promotor LTR o SV40, el lac o trp de *E. coli*, el promotor lambda P1 del fago y otros promotores conocidos por controlar la expresión de genes en células procarióticas y eucarióticas o sus virus. El vector de expresión también incluye una secuencia no codificadora para un sitio de unión de ribosoma para el inicio de la traducción y un terminador de transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión.

[0061] El vector que contiene la secuencia de ADN apropiada se describe arriba, así como un promotor o control de secuencia apropiado, puede emplearse para transformar un hospedero apropiado para permitir que el hospedero exprese la proteína. Ejemplos de organismos hospederos incluyen variedades de bacterias (por ejemplo *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Salmonella*, etc.), hongos (por ejemplo levaduras y otros hongos), hospederos animales o vegetales (por ejemplo células de ratón, cerdo

o de tejido animal o humano). La selección del hospedero se considera dentro del alcance de aquel con habilidad en el arte.

[0062] También se entiende que la secuencia de ADNc apropiada presente en el vector cuando se introduce en un hospedero puede expresar parte o solo una porción de la proteína que se codifica dentro de la terminología anotada, siendo suficiente que la proteína expresada pueda ser capaz de generar un anticuerpo u otra respuesta inmune que reconozca un epítipo de las secuencias de aminoácidos enumeradas.

[0063] El ADNc aislado y/o el polipéptido expresado por el hospedero transformado por el vector puede ser cosechado por métodos que se le ocurrirán a aquel con habilidad en el arte y utilizados en una vacuna para la protección de un mamífero, tal como perros, ganado, humanos, etc., contra infestaciones de especies de garrapatas *Ixodes* y no *Ixodes*. Tales proteínas recombinantes protectoras y/o ADNc modificados se usan en una cantidad efectiva para inducir una respuesta inmune contra tales garrapatas y sus patógenos asociados y pueden utilizarse en combinación con un portador apropiado fisiológicamente aceptable. El término "inducir una respuesta inmune" cuando se utiliza respecto a la vacuna descrita aquí significa que la vacuna previene enfermedades asociadas con una especie particular de garrapata o reduce la severidad de la enfermedad.

[0064] El portador empleado en conjunción con la vacuna puede ser uno de una amplia variedad de

1/2 260

portadores. Como ejemplos representativos de portadores apropiados, se pueden mencionar aceite mineral, polímeros sintéticos, etc. Los portadores para vacunas son bien conocidos en el arte y la selección de un portador apropiado se considera dentro del alcance de aquellos con habilidad en el arte. La selección del portador apropiado también dependerá de la manera en que se va a administrar la vacuna.

[0065] La presente invención proporciona un método para inmunizar un mamífero susceptible, contra las infestaciones y enfermedades causadas por las garrapatas con la vacuna descrita arriba. Para propósitos de la invención, la vacuna se administra en una cantidad efectiva. La vacuna puede administrarse por cualquiera de los métodos bien conocidos por aquellos con habilidad en el arte, por ejemplo, por inyección intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa. Alternativamente, la vacuna puede administrarse intranasalmente u oralmente. También debe entenderse que la vacuna puede incluir componentes activos, tales como patógenos generados por las garrapatas o ayudantes además del(los) antígeno(s) o fragmentos descritos arriba.

[0066] El hospedero que expresa el antígeno puede en sí mismo utilizarse para entregar el antígeno a animales no humanos, introduciendo células hospederas muertas o viables que son capaces de propagarse por el animal. La incorporación directa de secuencias de ADNc en las células hospederas también puede utilizarse para introducir secuencias en células animales para expresión del antígeno in vivo.

70 261

BIBLIOGRAFIA

Las siguientes referencias se incorporan aquí a modo de referencia:

Alberti E, Acosta A, Sarmiento ME, Hidalgo C, Vidal T, Fachado A, Fonte L, Izquierdo L, Infante JF, Finlay CM, Sierra G. Specific cellular and humoral immune response in Balb/c mice immunised with an expression genomic library of *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine* 1998; 16: 608-12.

Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, de la Fuente J. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine* 21, 1492-1501 (2003).

Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, de la Fuente J. Characterization of genes transcribed in an *Ixodes scapularis* cell line that were identified by expression library immunization and analysis of expressed sequence tags. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 7:9-25 (2000).

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-10.

Barry MA, Lai WC, Johnston SA. Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature* 1995; 377: 632-5.

Black WC 4th, Piesman J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10034-8.

77/262

Brayton KA, Vogel SW, Allsopp BA. Expression library immunization to identify protective antigens from *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. Immunogenicity of the *Brucella melitensis* recombinant ribosome recycling factor-homologous protein and its cDNA. *Vaccine* 2002; 20: 1660-9.

de la Fuente J, Kocan KM. 2003. Advances in the identification and characterization of protective antigens for development of recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Review of Vaccines*. 2:583-593.

de la Fuente J, Rodríguez M, Redondo M, Montero C, Garcia-Garcia JC, Mendez L, Serrano E, Valdes M, Enriquez A, Canales M, Ramos E, Boue O, Machado H, Lleonart R, de Armas CA, Rey S, Rodríguez JL, Artiles M, Garcia L. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine* 1998; 16: 366-73.

de la Fuente J, Rodríguez M, Montero C, Redondo M, Garcia-Garcia JC, Mendez L, Serrano E, Valdes M, Enriquez A, Canales M, Ramos E, Boue O, Machado H, Lleonart R. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genet Anal* 1999; 15: 143-8.

de la Fuente J, Rodríguez M, Garcia-Garcia JC. Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 916: 617-21.

263

De Rose R, McKenna RV, Cobon G, Tennent J, Zakrzewski H, Gale K, Wood PR, Scheerlinck JP, Willadsen P. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 71: 151-60.

de Vos S, Zeinstra L, Taoufik O, Willadsen P, Jongejan F. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Exp Appl Acarol* 2001; 25: 245-61.

Drew DR, Lightowlers M, Strugnell RA. Vaccination with plasmid DNA expressing antigen from genomic or cDNA gene forms induces equivalent humoral immune responses. *Vaccine* 1999; 18: 692-702.

Elad D, Segal E. Immunogenicity in calves of a crude ribosomal fraction of *Trichophyton verrucosum*: a field trial. *Vaccine* 1995; 13: 83-7.

Estrada-Peña A, Jongejan F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *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. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol* 1999; 23: 883-95.

Kofta W, Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Vet Parasitol* 2001; 100: 3-12.

177 204

Liyou N, Hamilton S, Elvin C, Willadsen P.
Cloning and expression of ecto 5'-nucleotidase from the
cattle tick *Boophilus microplus*. *Insect Mol Biol* 1999; 8:
257-66.

Liyou N, Hamilton S, Mckenna R, Elvin C,
Willadsen P. Localization and functional studies on the
5'-nucleotidase of the cattle tick *Boophilus microplus*.
Exp Appl Acarol 2000; 24: 235-46.

Manoutcharian K, Terrazas LI, Gevorkian G,
Govezensky T. Protection against murine cysticercosis
using cDNA expression library immunization. *Immunol Lett*
1998; 62: 131-6.

Melby PC, Ogden GB, Flores HA, Zhao W,
Geldmacher C, Biediger NM, Ahuja SK, Uranga J, Melendez
M. Identification of vaccine candidates for experimental
visceral leishmaniasis by immunization with sequential
fractions of a cDNA expression library. *Infect Immun*
2000; 68: 5595-602.

Moore RJ, Lenghaus C, Sheedy SA, Doran TJ.
Improved vectors for expression library immunization--
application to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in
pigs. *Vaccine* 2001; 20: 115-20.

Mulenga A, Sugimoto C, Onuma M. Issues in tick
vaccine development: identification and characterization
of potential candidate vaccine antigens. *Microbes Infect*
2000; 2: 1353-61.

Munderloh UG, Wang YLM, Chen C, Kurtti TJ.
Establishment, maintenance and description of cell lines
from the tick *Ixodes scapularis*. *J Parasitol* 1994; 80:
533-43.

HL 265

Nuttall PA. Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. Zentralbl Bakteriол 1999; 289: 492-505.

Parola P, Raoult D. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 80-3.

Silva CL. The potential use of heat-shock proteins to vaccinate against mycobacterial infections. Microbes and Infection 1999; 1: 429-35.

Singh RA, Wu L, Barry MA. Generation of genome-wide CD8 T cell responses in HLA-A*0201 transgenic mice by an HIV-1 ubiquitin expression library immunization vaccine. J Immunol 2002; 168: 379-91.

Smooker PM, Setiady YY, Rainczuk A, Spithill TW. Expression library immunization protects mice against a challenge with virulent rodent malaria. Vaccine 2000; 18: 2533-40.

van Drunen Littel-van den Hurk S, Loehr BI, Babiuk LA. Immunization of livestock with DNA vaccines: current studies and future prospects. Vaccine 2001; 19: 2474-9.

Wikel SK, Ramachandra RN, Bergman DK, Burkot TR, Piesman J. Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. Infect Immun 1997; 65: 335-8. Willadsen P. Novel vaccines for ectoparasites. Vet Parasitol 1997; 71: 209-22.

Willadsen P, Jongejan F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. Parasitol Today 1999; 15: 258-62.

11/10 766

Tabla 1. Primer examen de la biblioteca I.
Scapularis cDNA por ELI en ratones

Grupo experimental ^a	Número de grupos examinados (número de clones)	Número promedio $\pm$ SD de larvas unidas por ratón ^b	Número promedio $\pm$ SD de larvas devoradas por ratón ^c	Inhibición promedio $\pm$ SD de infestación de garrapatas (I) ^d	Número de grupos seleccionados para el examen secundario
Experimento 1	33 (1383)	50 $\pm$ 13 (33-80)	9 $\pm$ 3 (2-42)	39 $\pm$ 55% (-183 - 87%)	6 (I>75%)
Controles inmunizados con ADN vectorial para el experimento 1	- - - -	56 $\pm$ 13 (45-67)	16 $\pm$ 4 (5-27)	- - - -	- - - - -
Experimento 2	33 (1322)	56 $\pm$ 15 (29-79)	13 $\pm$ 4 (1-27)	27 $\pm$ 28% (-53 - 89%)	3 (I> 60%)
Controles inmunizados con ADN vectorial para el experimento 2	- - - -	54 $\pm$ 18 (36-73)	17 $\pm$ 3 (6-28)	- - - -	- - - - -

^a Se prepararon noventa y seis placas LBA que contienen un promedio de 41 ADNc clones por placa. Se realizaron las replicas y los clones de cada placa fueron agrupados, inoculados, desarrollados por 2 horas en una placa de cubetas 96 y el plásmido de ADN fue purificado de cada grupo para ELI. Cada uno de tres ratones por grupo fueron inmunizados IM dos veces con 1 μ g DNA/dosis en 50 μ g PBS dos semanas aparte. Cada uno de los tres ratones de dos grupos fueron incluidos como controles. Un grupo fue inyectado con el vector ADN y el segundo con salina únicamente.

^bQuince días después de la última inmunización, los ratones fueron infestados con 100 I. Scapularis larvas por ratón. Doce horas después, las larvas que no

177 267

se unieron fueron contadas para calcular el número de larvas unidas por ratón y los ratones fueron transferidos a nuevas jaulas.

^c Las larvas devoradas que se caen de cada ratón fueron recolectadas diariamente y contadas después de 7 días.

^d La inhibición de la infestación de garrapatas (I) por cada grupo de prueba se calculó con respecto a los controles inmunizados de vector como $[1 - (RL_n / RL_c \times RL_{ic} / RL_{in})] \times 100$, donde RL_n es el número promedio de larvas repletas recuperadas de cada ratón por cada grupo de gruepa, RL_c es el número promedio de larvas repletas recuperadas por ratón para el grupo de control, RL_{ic} es el número promedio de larvas unidas por ratón para el grupo de control, y RL_{in} es el número promedio de larvas unidas por ratón para cada grupo de prueba.

Tabla 2. Clasificación de los clones en grupos protectores mediante función de proteína putativa de acuerdo con la identidad de las bases de datos de la secuencia

Función de proteína putativa	Número de clones
Biosintético ^a	2
Catabolismo	4
Adhesión de célula	2
Ciclo de célula ^a	2
Citoesqueletal ^a	8
Defensa	2
Estructura o replica ADN ^a	3

H/ 268

Matriz extracelular	3
Endocitosis	2
Metabolismo de energía	10
Homeostasis	2
Morfogenética	9
Mitocondria ^a	34
Síntesis o procesamiento de proteína ^{a,b}	34
Síntesis o procesamiento ARN ^a	7
Proteínas de choque al calor	4
Transducción de señal	16
Transporte	8
Desconocido	199
Total	351

^aEliminado de un examen adicional de antígenos protectores. Otros clones se eliminaron por contener secuencias similares

^bExcepto para proteínas ribosómicas

277
269

Tabla 3. Agrupamiento de los clones de acuerdo con la función pronosticada de proteínas codificadas en sub-grupos para el examen terciario.

Sub-grupo (No. de clones)	Clon	Grupo ^a
Ribosómico (17)	1A2, 1A10, 1C11 1F6 2B8 2F8, 2F10 3A10, 2C3, 3D2, 3D10 3G9, 3G10 4D11, 4D12, 4E7, 4F7	A5 D1 A10 E8 B4 E3 F1
Proteína de membrana (7)	1D8, 1D11, 1E10 2B12 2H5 3C9 3G11	D1 A10 E8 B4 E3
ATPasa (6)	1A9, 1B2, 1C9 2C9 4A4 4G12	A5 A10 C3 F1
Transportador/canal de celda (5)	1F4 2H11 4A12 4G10, 4G11	D1 E8 C3 F1
Desarrollo temprano-específico (4)	1C8 3F4 4C7	A5 E3 C3
Vitelogenina (3)	1F12 4A6 4G2	D1 C3 F1
Choque al calor (3)	1C10 1F10 3F6	A5 D1 E3
Similar al EGF (2)	2H4 4C10	E8 C3
Proteína secretada (2)	2F9 3C12	E8 B4
Glutamina-Alanina rica (2)	4D6, 4E6	F1
Adaptina (1)	3E1	E3
Endopeptidasa (1)	4D8	F1
Nucleotidasa (1)	4F8	F1

18

272
270

*Los grupos ADNc se refieren a grupos positivos después de los exámenes primarios y secundarios (Figuras 2A y 2B).

27

273
271

Tabla 4: Resumen de los resultados con clones

I. Scapularis ADNc

Clon ADNc	Proteína pronosticada	Inhibición de infestación por garrapatas I (%)	Inhibición del proceso de muda M (%)	Eficacia E (%)
4D8	Endopeptidasa	40*/54**	7*/8**	44*/58**
4F8	Nucleotidasa	50*/64**	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	β-adaptina (región de apéndice)	27*	5*	31*
2C12	Proteína precursora Beta-amiloide (APP)	-8***	ND	ND
4F11	Bloqueo de la proliferación Bop1	-39***	ND	ND
3E10	Lectina de aglutinamiento de Manosa	-48*/-10***	ND	ND
4G11	Canal de cloruro	38***	30	57
3C12	Polimerasa III ARN	-104***	ND	ND
1A9, 1B2, 4A4	ATPasa	-57***	ND	ND

Los ratones fueron inmunizados con plásmido ADN de expresión que contiene ADNc tal como se describió arriba (*) o con 100 µg/dosis de proteína recombinante expresada en E. Coli (**). I, M y E fueron calculados como se describe arriba. ND, no determinado.

***Resultados en una actividad pro-alimentadora. Este efecto puede deberse a la expresión

172

272

de ADNc codificándose para los inmunosupresores de garrapata, anticoagulantes y otras proteínas con baja antigenicidad y una actividad pro-alimentante. Alternativamente, ellos pudieron codificarse para proteínas homólogas para hospedar las proteínas con actividad anti-garrapatas, cuya neutralización resulta en una actividad pro-alimentadora de garrapatas.

273
273

Tabla 5. Condiciones RT-PCR para la
caracterización de perfiles de expresión de ADNc
protectores de garrapata

ADNc	RT-PCR primarios (5' - 3')	Condiciones PCR ^a	Tamaño de banda ADNc ^b	Tamaño de banda ADN ^c
4F8	4F8R5: GCGTCGTGTGGAGCATCAGCGAC (SEQ ID NO: 32) 4F8-R: TCGCAACGGACAACGGCAGGTTG (SEQ ID NO: 33)	94°C, 30 seg 61°C, 30 seg 68°C, 2 min	972 bp	>1,600 bp
4D8	4D8R5: GCTTGCGCAACATTAAAGCGAAC (SEQ ID NO: 34) 4D8-R: TGCTTGTTTGAGATGCCCATCA (SEQ ID NO: 35)	94°C, 30 seg 56°C, 30 seg 68°C, 1 min	577 bp	>1,600 bp
4E6	4E6R5: GAAATATCTGTGAAACCAAGGCC (SEQ ID NO: 36) 4E6U-R: ATTGACACACATCATTAAGT (SEQ ID NO: 37)	94°C, 30 seg 52°C, 30 seg 68°C, 1 min	138 bp	~1,600 bp

^aLas condiciones PCR se indican para los pasos de desnaturalización, recocido y polimerización, respectivamente.

^bcalculado de la secuencia del inserto de cDNA

^cEstimado del PCR del DNA genómico IDE8

Tabla 6. Perfil de expresión de los mRNA que se codifican para los antígenos protectores en garrapatas

Fuente ARN	I. scapularis	I. pacificus	I. ricinus	A. americanum	D. variabilis	R. sanguineus	B. microplus
	I D E g g m n y t S a l i v a l G						

~~274~~

~~276~~
274

La expresión de los mRNA que se codifican para antígenos protectores de garrapatas 4F8, 4D8 y 4E6 se analizó mediante RT-PCR en diferentes especies de garrapatas que utilizan los primarios derivados de las secuencias I. Scapularis.

1180
277
275

Tabla 7. Resultados de la vacunación con antígenos protectores de garrapatas recombinantes sobre las ninfas *I. Scapularis*, *D. Variabilis* y *A. Americanum*

Especies de garrapatas	Inhibición de infestación ninfal de garrapatas (%) ^a				Reducción en el peso de ninfas devoradas (%) ^b			
	4D8	4F8	4E6	A11	4D8	4F8	4E6	A11
<i>I. Scapularis</i>	35	39	0	63	0	0	0	0
<i>D. Variabilis</i>	22	0	5	8	32	0	27	0

^a Determinado con respecto al número de ninfas devoradas recuperadas del grupo de control tal como se describió arriba para las infestaciones larvales de garrapatas.

^b Peso promedio por ninfa devorada con respecto al peso de ninfas recolectado del grupo de control.

[0067] En vista de lo anterior, será observado que se logran algunos objetivos de la invención así como se obtienen otros resultados ventajosos. Como varios cambios podrían ser hechos en las anteriores moléculas de ADN, proteínas, etc. sin salirse del alcance de la invención, se pretende que toda la materia contenida en la presente descripción o mostrada en los dibujos que se acompañan se interpretarán como ilustrativos y no en un sentido limitativo. Mientras la invención ha sido descrita con un cierto grado de particularidad, se

228
226

entiende que la invención no está limitada a la(s)
modalidad(es) establecida(s) aquí para los propósitos de
ejemplificación, sino que es limitada únicamente por el
alcance de la reivindicación o reivindicaciones anexas,
incluyendo el rango completo de equivalencia en el cual
se nombra a cada elemento de la misma.

HA 224
227

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un polipéptido aislado seleccionado del grupo que consiste de polipéptidos derivados de garrapata designados 4D8, 4F8 y 4E6.

2. Una composición de vacuna anti-garrapata de múltiples especies que comprende el polipéptido de la reivindicación 1 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

3. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende el polipéptido derivado de garrapata 4D8.

4. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de por lo menos una de SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO: 31, o SEQ ID NO:39.

5. Una composición de vacuna anti-garrapata de múltiples especies que comprende el polipéptido de la reivindicación 4 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

6. El polipéptido de la reivindicación 4, donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.

7. El polipéptido de la reivindicación 4, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

8. El polipéptido de la reivindicación 4, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29.

290
278

9. El polipéptido de la reivindicación 4, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31.

10. El polipéptido de la reivindicación 4, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39.

11. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 95% homóloga a por lo menos una de SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO: 31, o SEQ ID NO:39.

12. Una molécula aislada de ADNc la cual codifica un polipéptido antigénico derivado de garrapata, dicha molécula tiene una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 95% homóloga a por lo menos los residuos 1-117 de SEQ ID NO: 1.

13. Un vector de expresión que comprende la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 12.

14. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la reivindicación 13.

15. Una vacuna anti-garrapatas de múltiples especies que comprende una cantidad efectiva inmunizante de un inmunógeno seleccionado a partir del grupo que consiste de (i) la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 12, (ii) el polipéptido codificado por la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 12, y (iii) una combinación de la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 12 y el polipéptido codificado, y que comprende adicionalmente un portador o diluyente

279
281

farmacéuticamente aceptable.

16. Un método para inducir una respuesta inmune en un mamífero contra la infestación de garrapatas de múltiples especies y sus patógenos asociados, que comprende administrar al mamífero la vacuna de la reivindicación 15.

17. El polipéptido codificado por la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 12.

18. Una molécula aislada de ADNc la cual codifica un polipéptido antigénico derivado de garrapata, dicha molécula tiene una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 95% homóloga a por lo menos los residuos 80-575 de SEQ ID NO: 3.

19. Un vector de expresión que comprende la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 18.

20. Una célula aislada transformada mediante el vector de expresión de la reivindicación 19.

21. Una vacuna anti-garrapatas de múltiples especies que comprende una cantidad efectiva inmunizante de un inmunógeno seleccionado a partir del grupo que consiste de (i) la molécula aislada de cDNA de la reivindicación 18, (ii) el polipéptido codificado por la molécula aislada de cDNA de la reivindicación 18, y (iii) una combinación de la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 18 y el polipéptido codificado, y que comprende adicionalmente un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

282
280

22. Un método para inducir una respuesta inmune en un mamífero contra la infestación de garrapatas de múltiples especies y sus patógenos asociados, que comprende administrar al mamífero la vacuna de la reivindicación 21.

23. El polipéptido codificado por la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 18.

24. Una molécula aislada de ADNc la cual codifica un polipéptido antigénico derivado de garrapata, dicha molécula tiene una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 95% homóloga a por lo menos los residuos 10-951 de SEQ ID NO: 5.

25. Un vector de expresión que comprende la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 24.

26. Una célula aislada transformada mediante el vector de expresión de la reivindicación 25.

27. Una vacuna anti-garrapata de múltiples especies que comprende una cantidad efectiva inmunizante de un inmunógeno seleccionado del grupo que consiste de (i) la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 24, (ii) el polipéptido codificado por la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 24, y (iii) una combinación de la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 24 y el polipéptido codificado, y que comprende adicionalmente un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

28. Un método para inducir una respuesta inmune en un mamífero contra la infestación de garrapatas de múltiples especies y sus patógenos asociados, que

comprende administrar al mamífero la vacuna de la reivindicación 27.

29. El polipéptido codificado por la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 24.

30. Una molécula aislada de ADNc la cual codifica un polipéptido antigénico derivado de garrapata, dicha molécula tiene una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 95% homóloga a SEQ ID NO: 26.

31. Un vector de expresión que comprende la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 30.

32. Una célula aislada transformada mediante el vector de expresión de la reivindicación 31.

33. Una vacuna anti-garrapata de múltiples especies que comprende una cantidad inmunizante efectiva de un inmunógeno seleccionado a partir del grupo que consiste de (i) la molécula aislada ADNc de la reivindicación 30, (ii) el polipéptido codificado por la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 30, y (iii) una combinación de la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 30 y el polipéptido codificado, y que comprende adicionalmente un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

34. Un método para inducir una respuesta inmune en un mamífero contra la infestación de garrapatas de múltiples especies y sus patógenos asociados, que comprende administrar al mamífero la vacuna de la reivindicación 33.

MP 284
282

35. El polipéptido codificado por la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 30.

36. Una molécula aislada de ADNc la cual codifica un polipéptido antigénico derivado de garrapata, dicha molécula tiene una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 95% homóloga a SEQ ID NO: 28.

37. Un vector de expresión que comprende la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 36.

38. Una célula aislada transformada mediante el vector de expresión de la reivindicación 37.

39. Una vacuna anti-garrapata de múltiples especies que comprende una cantidad efectiva inmunizante de un inmunógeno seleccionado del grupo que consiste de (i) la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 36, (ii) el polipéptido codificado por la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 36, y (iii) una combinación de la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 36 y el polipéptido codificado, y que comprende adicionalmente un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

40. Un método para inducir una respuesta inmune en un mamífero contra la infestación de garrapatas de múltiples especies y sus patógenos asociados, que comprende administrar al mamífero la vacuna de la reivindicación 39.

41. El polipéptido codificado por la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 36.

42. Una molécula aislada de ADNc la cual

205
283

codifica un polipéptido antigénico derivado de garrapata, dicha molécula tiene una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 95% homóloga a SEQ ID NO: 30.

43. Un vector de expresión que comprende la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 42.

44. Una célula aislada transformada por el vector de expresión de la reivindicación 43.

45. Una vacuna anti-garrapata de múltiples especies que comprende una cantidad inmunizante efectiva de un inmunógeno seleccionado del grupo que consiste de (i) la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 42, (ii) el polipéptido codificado por la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 42, y (iii) una combinación de la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 42 y el polipéptido codificado, y que comprende adicionalmente un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

46. Un método para inducir una respuesta inmune en un mamífero contra la infestación de garrapatas de múltiples especies y sus patógenos asociados, que comprende administrar al mamífero la vacuna de la reivindicación 45.

47. El polipéptido codificado por la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 42.

48. Una molécula aislada de ADNc la cual codifica un polipéptido antigénico derivado de garrapata, dicha molécula tiene una secuencia de nucleótidos que es por lo menos 95% homóloga a SEQ ID NO: 38.

179

296
284

49. Un vector de expresión que comprende la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 48.

50. Una célula aislada transformada mediante el vector de expresión de la reivindicación 49.

51. Una vacuna anti-garrapata de múltiples especies que comprende una cantidad inmunizante efectiva de un inmunógeno seleccionado a partir del grupo que consiste de (i) la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 48, (ii) el polipéptido codificado por la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 48, y (iii) una combinación de la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 48 y el polipéptido codificado, y que comprende adicionalmente un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

52. Un método para inducir una respuesta inmune en un mamífero contra infestación de garrapatas de múltiples especies y sus patógenos asociados, que comprende administrar al mamífero la vacuna de la reivindicación 51.

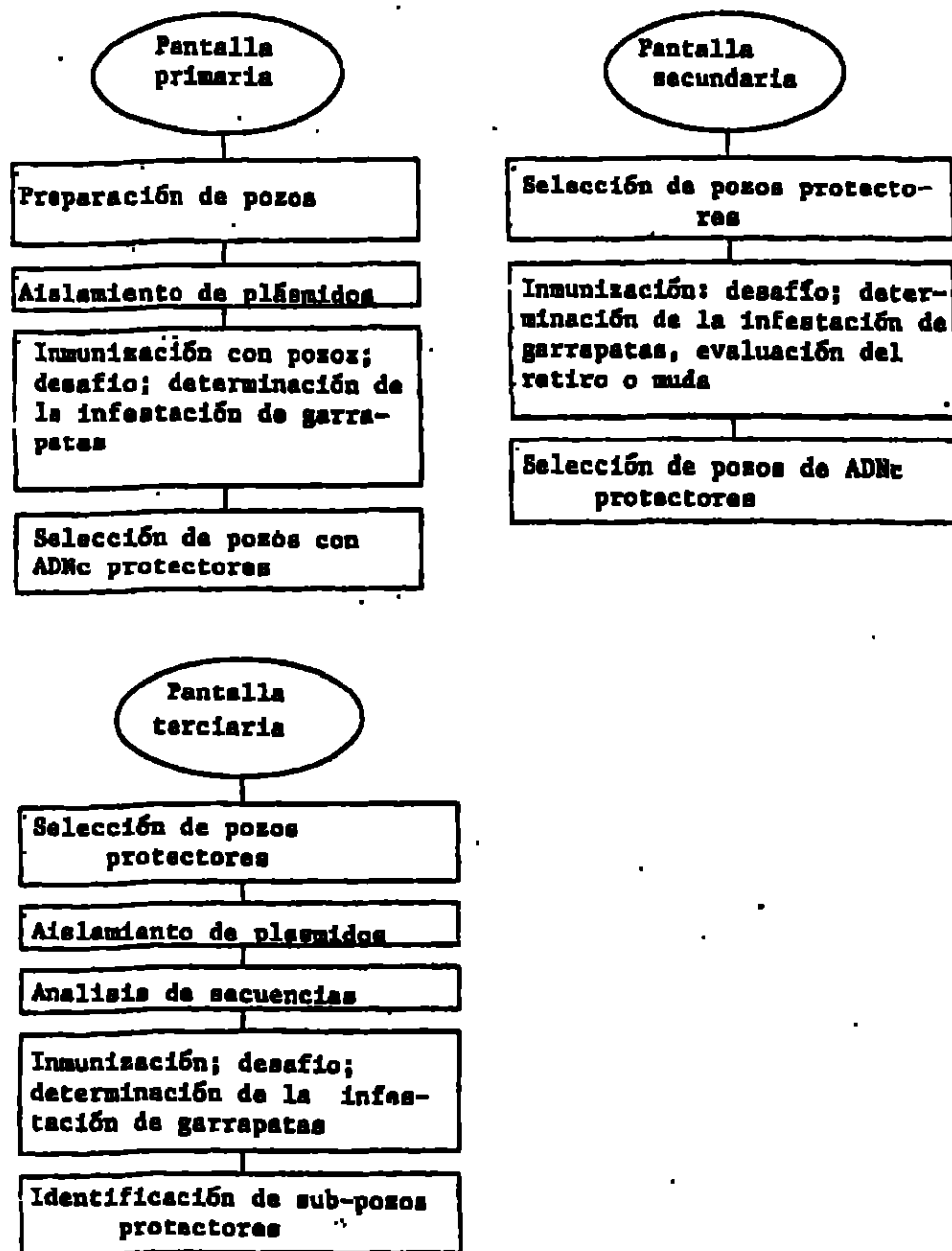
53. El polipéptido codificado por la molécula aislada de ADNc de la reivindicación 48.

EXTRACTO DE LA DESCRIPCION

Antígenos protectores de amplio rango contra infestaciones de garrapata, secuencias de gen y proteínas codificadas para dichos antígenos, vacunas relacionadas y métodos útiles para inducir una respuesta inmune.

W #284053 v1

FIG. 1



147

289
287

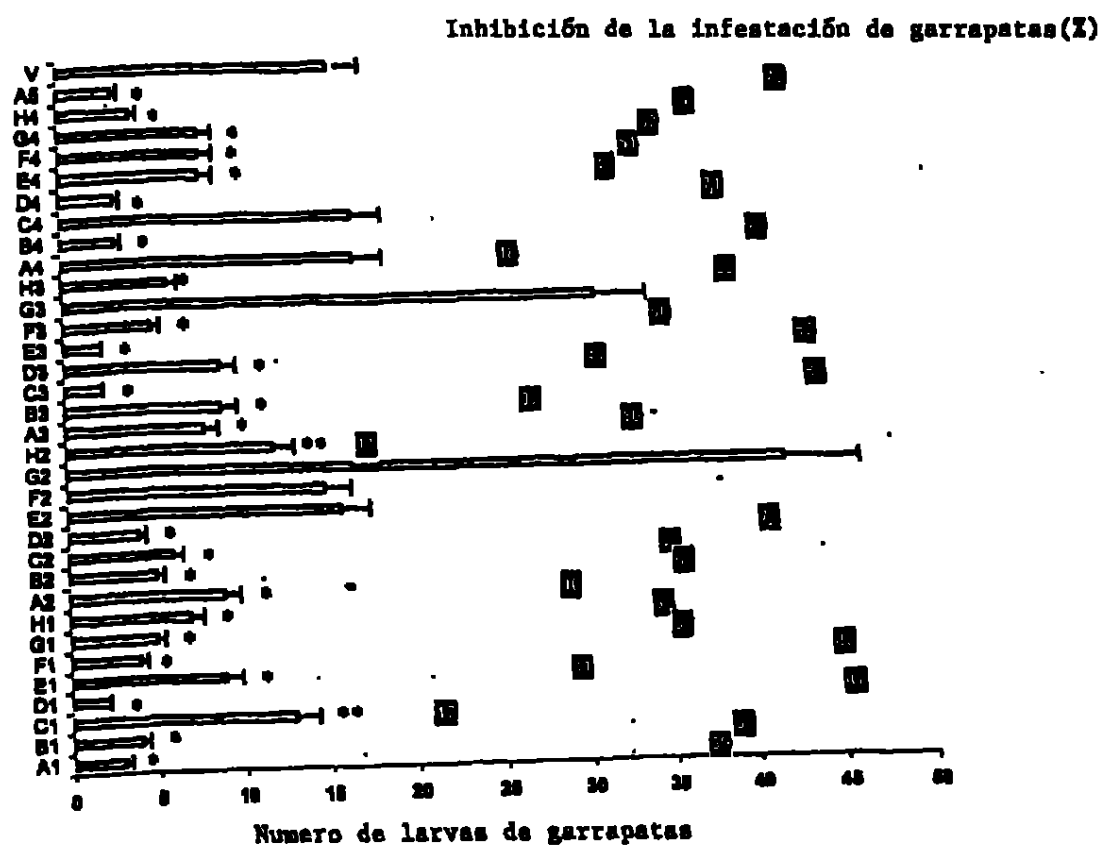


FIG. 2A

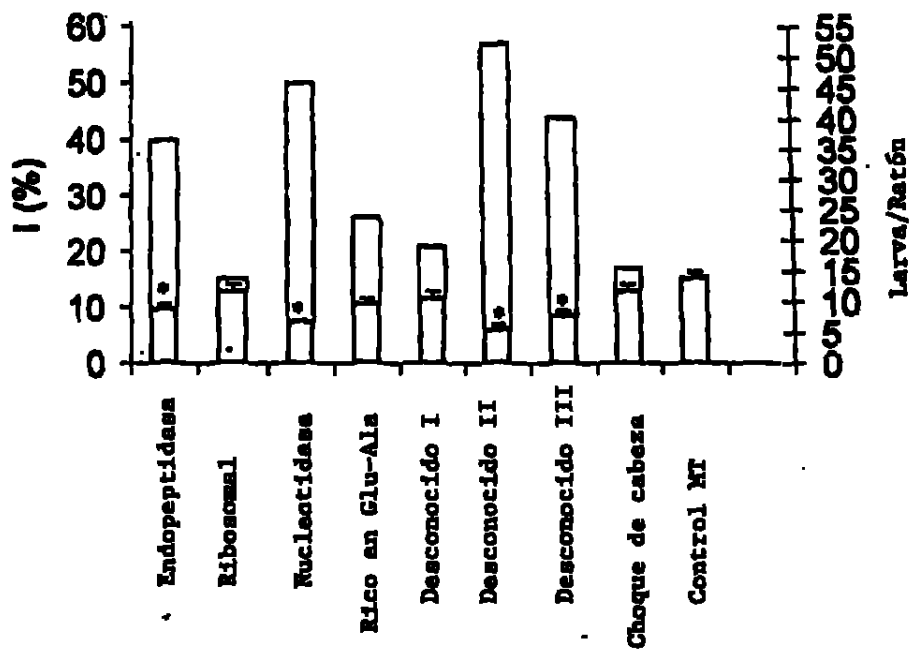


FIG. 3

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 282

290

2020
Bogotá D C ,

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY

REFERENCIA	Radicación No	05 108673
	Trámite	2
	Evento	1
	Actuación	416
	Oficio No	2844
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión

Siendo manifestación expresa del interesado de efectuar la publicación "inmediato", esta se realizará en la próxima gaceta de Propiedad Industrial

Cumplase
Dado en Bogotá DC,

27 MAR 2007

ALIX CARMENZA OSPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpa10