

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.**

05-108673

54. **TITULO** ANTIGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE
GARRAPATAS DE MULTIPLES ESPECIES

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL**

A61K 39/00

71. **SOLICITANTE** THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY

DOMICILIO

STILLWATER, OKLAHOMA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. **SANTAFE DE BOGOTA, D.C.**

PETITORIO

AS: 99.636

1

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SEMINARIO 1.000.000
Radicator : 05100075 00000000 Folios: 3.
Fecha (FOLIO): 2005-10-25 16:54:16
Tramite : 002 PATENTE D 1 MENSIÓN 4 : PRESENCIAL
Dependencia: 2002 DIVISION DE MARCAS Y DISEÑOS

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY Dirección: 203 Whitehurst Oklahoma State University, Stillwater, OK 74078, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América Lugar de Constitución: Estados Unidos de América Teléfono: _____ Fax: _____ E-mail: _____	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____	
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9 Teléfono: 380-2200 Fax: 380-2700 E-mail: _____	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 80.410.337 TP 57492	
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: Jose de Jesus de La Fuente, Katherine M. Kocan, Consuelo Garcia-Alamazan, Edmour F. Blouin Dirección: 400 Squires Landing, Apt. M-5, Stillwater, OK 74074, Estados Unidos de América; 3909 E. 92nd Street, Perkins, OK 74059, Estados Unidos de América; Prol. Aldama 1424, Frac. La Sierra, Ca. Ucetoria, Tam. CP. 87037, México; 3909 E. 92nd Street, Perkins, OK 74059, Estados Unidos de América, (Respectivamente) Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América y México (Respectivamente)		
5 Título (54): ANTIGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE GARRAPATAS DE MULTIPLES ESPECIES			
6 Clasificación Internacional (51) <u>A61K 39/00</u>			
7 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	US	25-10-2004	10.972.789
8 Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los: 6 meses ☒ 12 meses ☐ 18 meses ☐ Otro ☐			
9 Comprobante de pago No. 05-76356-0574643 Fecha 25-10-2005			

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

10

ANEXOS

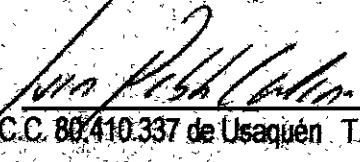
2

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud \$443.000
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. \$124.000
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Certificado de la fecha de presentación de la solicitud prioridad expedida por la autoridad correspondiente y una copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad.
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Resumen
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones.
- ☒ Dibujos y/o planos necesarios.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☒ Otros. Tarjeta de Propietarios.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA: 

C.C. 80/410.337 de Usaquén T.P. 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 76.356
FECHA : OCTUBRE 4 DE 2005

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicación : 051005/3 00000004 Folios: 53
Fecha (IMP): 2005-10-25 16:33:16
Trámite : OMC PATENTES D 1 RECURSIVO 411 PRESENTAC
Dependencia: OMC PROVISIÓN DE NUEVAS OPERACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	30712175	04/10/2005	32,038,900.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.
		TOTAL :	\$ 443,000.

SOM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

7

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación : 0500573 000000000
Fecha 05005-10-25 16:30:16
Trámite : 012 PATENTES D 1 REQUISITO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 0000 DIVISION DE MARCAS COMERCIALES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176009-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 74.643
FECHA : SEPTIEMBRE 27 DE 2005

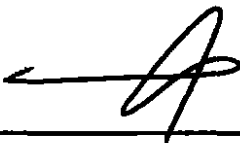
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIBARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	30712453	27/09/2005	17,030,360.00

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

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN MU	124,000.
	TOTAL :	\$ 124,000.

SON: CIENTO VEINTICUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

SOLICITANTE/S. RAZON SOCIAL O APELLIDOS Y NOMBRES THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY

DOMICILIO STILLWATER, OKLAHOMA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

TITULO ANTIGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE GARRAPATAS DE MULTIPLES ESPECIES

CLASIFICACION _____

EXPEDIENTE No. _____ FECHA DE SOLICITUD _____ ROLLO MICROFILM _____

CERTIFICADO No. _____ FECHA DE CONCESION _____ VIGENCIA DESDE _____ HASTA _____

PRORROGA _____ CAMBIO DE NOMBRE _____

TRASPASO A _____

INVENTOR (ES) JOSE DE JESUS DE LA FUENTE, KATHERINE M. KOCAN, CONSUELO GARCIA-ALAMAZAN,

OTROS EDMOUR F. BLOUIN

OFICINA DE COMUNICACIONES



ANTIGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE INFESTACION DE GARRAPATAS DE MÚLTIPLES ESPECIES

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud es una continuación parcial de la solicitud codependiente de Estados Unidos con Número de Serie 10/425,653, presentada el 29 de abril de 2003, solicitud que reivindica el beneficio de la solicitud de patente de Estados Unidos con número de serie provisional 60/376,251 presentada el 29 de abril de 2002.

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 distribuida 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. aponica* 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.*



5

phagocytophila (Estrada-Peña y Jongejan, 1999; Parola y Raoult, 2001). Por otro lado la *Ixodes*, otra especie de garrapata de importancia médica y veterinaria incluye los del género *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Boophilus*.

[0004] El control de la infestación de garrapatas es difícil y a veces poco práctico para garrapatas con múltiples huéspedes 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; Garcia-Garcia 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 huésped (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 incluida 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 Plesman, 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 cADN 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 genoma.

[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.

RESUMEN 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 *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 relacionadas al *I. scapularis*, *I. pacificus* y *I. ricinus*, y *D. variabilis*, *R. sanguineus* y *A. americanum* por RT-PCR usando los iniciadores específicos para las secuencias conocidas de *I. scapularis*. La expresión se detectó en *I. ricinus* para 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 3D8 y 4E6 en especies de garrapatas no *Ixodes* fue la base para un experimento en el que se inmunizaron conejos con aF8, 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 cADN, 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 cADNs 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 cADNs 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 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 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 cADN utilizado para identificar antígenos protectores contra la infestación de *I. Scapularis*.

[0016] La FIGURA 2 es un gráfico que muestra los resultados de la selección primaria de los conjuntos de cADN (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 cADN (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 cADN 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 cADN 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 cADN 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 cADN del *I. scapularis* y tamizado de antígenos protectores por ELI.

Células de garrapata

[0021] 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 cultivadas 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 cADN en el vector pEXP1 que contendría 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 cADN 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 cADN. El tamaño promedio del cADN 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 u análisis de secuencia se muestra en la figura 1.

[0024] Se prepararon noventa y seis placas LBA (maestras) que contenían un promedio de 41 (30 – 61) clones de cADN por placa. Se hicieron réplicas de cada placa y los clones de cada placa fueron agrupados, inoculados en Luria-Bertani con 50 µg/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, 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 calculo respecto a los controles inmunizados con el vector como $[1 - (\frac{n}{c} \times \frac{ic}{in})] \times 100$, en donde n es el número promedio de larvas repletas recuperadas por ratón de cada grupo de prueba, c es el número promedio de larvas repletas recuperadas por ratón del grupo de control, ic es el número promedio de larvas unidas por ratón para el grupo de control, y in es el número promedio de larvas unidas por ratón para cada grupo de prueba.

[0025] Los conjuntos de 41 (30 – 61) clones de cADN de *I. scapularis* se seleccionaron por ELI. Solamente se analizaron 33 conjuntos de cADN 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 cADN 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 cADN 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 cADN B5, A8 y A10 (Figura2) 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 cADN considerando la complejidad del genoma de la garrapata. Sin embargo, para nuestra sorpresa se identificaron 9 conjuntos de cADN protector después de la selección de 66 conjuntos que contenían más de 2705 clones de cADN. 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).

14

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 cADN protector. por lo tanto no continuamos seleccionado nuevos conjuntos de cADN 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 cADN seleccionados después de la selección primaria (Figura 2A y 2B). Después de la selección primaria de 66 conjuntos de cADN (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 recolección de larvas. La inhibición del cambio de piel (M) para cada grupo se calculó respecto a los controles inmunizados con el vector como $[1 - (ML_n/ML_c \times RL_c/RL_n)] \times 100$ donde ML_n es el número de ninfas para cada grupo de prueba, ML_c es el número de ninfas para el grupo de control, RL_c es el número de larvas recuperadas para el grupo de control, y RL_i 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 $100 \mu g$ de proteínas de células IDE8 de garrapata por dosis en el ayudante incompleto de Freund.

[0027] Todos los 9 conjuntos de cADN 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 cADN 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 cADN, 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

75

cADN (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 cADN salvo uno. La inhibición del cambio de piel en los ratones de prueba inmunizados con cADN en comparación con el grupo de control inmunizado con cADN 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 cADN 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 cADN 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 cADN varió entre 3% a 18% ($7 \pm 5\%$) mientras que en los grupos de control inmunizados con solución salina y cADN 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 inmunizaron con 0.3 μg /plásmido/dosis en PBS de 50 μl y se evaluaron como se describe arriba. Los ratones de control se inmunizaron con un conjunto de 20 plásmidos que contenían cADNs 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 cADN 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 $\geq 15\%$ (Figura 3). Más aun, entre ellos, los grupos inmunizados con subconjuntos que contenían clones con endopeptidasa, nucleotidasa putativas y dos de los subconjuntos de cADN 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 $\geq 40\%$ (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.

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 cADN 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 cADN positivo y los conjuntos de F2 cADN negativos (selección secundaria) o entre ratones de prueba inmunizados con subconjuntos de cADN y ratones inmunizados con cADNs mitocondriales (selección terciaria).

Ejemplo 2: Análisis de la secuencia para clones protectores

[0032] Todos los 351 clones de cADN 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

12

(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. 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 peptidoglucano, 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.

[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.

28

[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.

[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:4.

[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

12

en la SEQ ID NO:22.

[0046] SEQ ID NO:22, 23 Y 24 denotan respectivamente los clones designados 1^a9, 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 salivares disectadas de 10 machos *D. variabilis*, glándulas salivares 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 µl de agua esteril desionizada, tratada con dietil policarbonato. Las reacciones RT-PCR se realizaron usando el acceso al sistema RT-PCR (Promega, madison, WI, Estados Unidos de América). Un µL de ARN se transcribo de manera reversa en 50 µL de una mezcla de reacción (1.5 mM de MgSO₄, virus 1X de mieloblastosis aviaria (AMV) amortiguador de reacción RT/*Thermus flavus* (Tff), 10 mM de hexamero aleatorio, 0.2 mM de

cada trifosfato deoxinucleósido (fNTP), 5U AMV RT, 5u T7 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 cADN 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 cADN 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.

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

Resultados

Expresión de cADNs 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 inmunobloquímica, 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 cADN, 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.

[0053] Las secuencias de los cADNs de 4D8 de *D. variabilis*, *A.*

22

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 *Ixodes* 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).

[0055] El experimento 3, entonces, demuestra la sorprendente 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 cADN 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 cADN 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 una anticuerpo u otra respuesta inmune que reconoce un epítopo 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 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 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

26/24

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 reconozca un epítipo de una secuencia de aminoácidos mostrada y un mutante de dicha secuencia capaz de generar un anticuerpo u otra respuesta inmune que reconozca un epítipo 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 procedimientos y otros se consideran conocidos por aquellos con habilidad en el arte. Vectores apropiados incluyen secuencias de ADN cromosomal, no comosomal, 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. E vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la

20
25

expresión.

[0061] El vector que contiene la secuencia de cADN apropiada se describe arriba, así como un promotor o control de secuencia apropiado, puede emplearse para transformar un huésped apropiado para permitir que el huésped exprese la proteína. Ejemplos de organismos huésped incluyen variedades de bacterias (por ejemplo *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Salmonella*, etc.), hongos (por ejemplo levaduras y otros hongos), huéspedes animales o vegetales (por ejemplo células de ratón, cerdo o de tejido animal o humano). La selección del huésped se considera dentro del alcance de aquel con habilidad en el arte.

[0062] También se entiende que la secuencia de cADN apropiada presente en el vector cuando se introduce en un huésped 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 epítopo de las secuencias de aminoácidos enumeradas.

[0063] El cADN aislado y/o el polipéptido expresado por el huésped 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 *Ixodas* y *no Ixodas*. Tales proteínas recombinantes protectoras y/o cADNs 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 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 antígeno o fragmentos descritos arriba.

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

BIBLIOGRAFIA

Las siguientes referencias se incorporan aquí a modo de referencia:

Alberti E, Acosta A, Samliento 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.

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: 1860-9.

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, Ariles 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.

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.

García-García JC, González IL, González DM, Valdes M, Méndez L, Lamberti J, D'Agostino B, Citroni D, Frágoso H, Ortiz M, Rodríguez 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.

Liyu 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.

Liyu 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

30

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.

Nuttall PA. Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. *Zentralbl Bakteri* 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, Ralnczuk A, Spithill TW. Expression library immunization protects mice against a challenge with virulent rodent

4

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, Plesman 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, Jongejans F. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol Today* 1999; 15: 258-62.

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 (>75%)
Controles Inmunizados con ADN vectorial para el experimento 1	----	56 $\pm$ 13 (45-67)	18 $\pm$ 4 (5-27)	----	-----
Experimento 2	33 (1322)	56 $\pm$ 15 (29-79)	13 $\pm$ 4 (1-27)	27 $\pm$ 28% (-53 - 89%)	3 (> 80%)
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 cADN 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 se unieron fueron contadas para calcular el número de larvas unidas por ratón y los ratones fueron transferidos a nuevas jaulas.

^cLas larvas devoradas que se caen de cada ratón fueron recolectadas diariamente y

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

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	A5
	1F6	D1
	2B8	A10
	2F8, 2F10	E8
	3A10, 2C3, 3D2, 3D10	B4
	3G8, 3G10	E3
	4D11, 4D12, 4E7, 4F7	F1
Proteína de membrana (7)	1D8, 1D11, 1E10	D1
	2B12	A10
	2H5	E8
	3C9	B4
	3G11	E3
ATPasa (6)	1A9, 1B2, 1C9	A5
	2C9	A10
	4A4	C3
	4G12	F1
Transportador/canal de célula (5)	1F4	D1
	2H11	E8
	4A12	C3
	4G10, 4G11	F1
Desarrollo temprano-específico (4)	1C8	A5
	3F4	E3
	4C7	C3
	4G9	F1
Receptor acoplado de	2B7, 2C12	A10



proteína G (4)	2F12	E8
	4C9	C3
Receptor de factor de crecimiento (3)	2E8	B5
	3B8, 3C8	B4
Lectina (3)	3E10	E3
	4B8, 4C8	C3
Vitelogenina (3)	1F12	D1
	4A6	C3
	4G2	F1
Choque al calor (3)	1C10	A5
	1F10	D1
	3F8	E3
Similar al EGF (2)	2H4	E8
	4C10	C3
Proteína secretada (2)	2F9	E8
	3C12	B4
Glutamina-Alanina rica (2)	4D8, 4E8	F1
Adaptina (1)	3E1	E3
Endopeptidasa (1)	4D8	F1
Nucleotidasa (1)	4F8	F1

Los grupos cADN se refieren a grupos positivos después de los exámenes primarios y secundarios (Figuras 2A y 2B).

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

Clon cADN	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	27*	5*	31*

24

	de apéndice)			
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 cADN 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 de cADNs 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.

Tabla 5. Condiciones RT-PCR para la caracterización de perfiles de expresión de cADNs protectores de garrapata .

cADN	RT-PCR primarios (5' - 3')	Condiciones PCR ^a	Tamaño de banda cADN ^b	Tamaño de banda ADN ^c
4F8	4F8R5: GCGTCGTGTGGAGCATCAGCGAC (SEQ ID NO: 32) 4F8-R: TCGCAACGGACAACGGCAGGTTG (SEQ ID NO: 33)	94°C, 30 seg 81°C, 30 seg 88°C, 2 min	972 bp	>1,800 bp
4D8	4D8R5:	94°C, 30 seg		

^bcalculado de la secuencia del inserto de cDNA

Tabla 6. Perfil de expresión de los mARN 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 S	e g g s	n y m p h s	g u t s	Saliva G l a n d s						
Clon	Expresión mRNA										

1

^cEstimado del PCR del DNA genómico IDE8

Tabla 6. Perfil de expresión de los mARN 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 S	e g g s	n y m p h s	g u t s	Saliva G l a n d s		
Clon	Expresión mRNA						

26/38

4F8	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
4D8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4E6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

La expresión de los mARN 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*.

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
<i>A. Americanum</i>	17	9	36	12	3	1	0	16

^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.

24

[0067] En vista de lo anterior, se verá se logran que 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 limitante. Mientras la invención ha sido descrita con un cierto grado de particularidad, se entiende que la invención no está limitada a las modalidad(es) establecidas aquí para los propósitos de ejemplificación, pero está 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.

40

REVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado seleccionado del grupo que consiste de polipeptidos 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, 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, donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.



8. El polipéptido de la reivindicación 4, donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29.

9. El polipéptido de la reivindicación 4, donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31.

10. El polipéptido de la reivindicación 4, 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 cADN la cual codifica un polipéptido antigénico derivado de garrapata, dicha molécula tiene una secuencia nucleótida 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 cADN 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 cADN de la reivindicación 12, (ii) el polipéptido codificado por la molécula aislada de cADN de la reivindicación 12, y (iii) una combinación de la molécula aislada de cADN de la reivindicación 12 y el polipéptido codificado, y que comprende adicionalmente un portador o diluyente 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 cADN de la reivindicación 12.

18. Una molécula aislada de cADN la cual codifica un polipéptido antigénico derivado de garrapata, dicha molécula tiene una secuencia nucleótida 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 cADN de la reivindicación 18.

20. Una célula aislada transformada mediante el vector de expresión de la

47

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 cADN de la reivindicación 18 y el polipéptido codificado, y que comprende adicionalmente un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

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 cADN de la reivindicación 18.

24. Una molécula aislada de cADN la cual codifica un polipéptido antigénico derivado de garrapata, dicha molécula tiene una secuencia nucleótida 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 cADN de la reivindicación 24.

44

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 cADN de la reivindicación 24, (ii) el polipéptido codificado por la molécula aislada de cADN de la reivindicación 24, y (iii) una combinación de la molécula aislada de cADN 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 cADN de la reivindicación 24.

30. Una molécula aislada de cADN la cual codifica un polipéptido antigénico derivado de garrapata, dicha molécula tiene una secuencia nucleótida que es por lo menos 95% homóloga a SEQ ID NO: 28.

31. Un vector de expresión que comprende la molécula aislada de cADN 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 cADN de la reivindicación 30, (ii) el polipéptido codificado por la molécula aislada de cADN de la reivindicación 30, y (iii) una combinación de la molécula aislada de cADN 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.

35. El polipéptido codificado por la molécula aislada de cADN de la reivindicación 30.

36. Una molécula aislada de cADN la cual codifica un polipéptido antigénico derivado de garrapata, dicha molécula tiene una secuencia nucleótida que es por lo menos 95% homóloga a SEQ ID NO: 28.



37. Un vector de expresión que comprende la molécula aislada de cADN 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 cADN de la reivindicación 36, (ii) el polipéptido codificado por la molécula aislada de cADN de la reivindicación 36, y (iii) una combinación de la molécula aislada de cADN 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 cADN de la reivindicación 36.

42. Una molécula aislada de cADN la cual codifica un polipéptido antigénico derivado de garrapata, dicha molécula tiene una secuencia nucleótida que es por lo menos 95% homóloga a SEQ ID NO: 30.

43. Un vector de expresión que comprende la molécula aislada de cADN 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 cADN de la reivindicación 42, (ii) el polipéptido codificado por la molécula aislada de cADN de la reivindicación 42, y (iii) una combinación de la molécula aislada de cADN 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 cADN de la reivindicación 42.

48. Una molécula aislada de cADN la cual codifica un polipéptido

48

antigénico derivado de garrapata, dicha molécula tiene una secuencia nucleótida que es por lo menos 95% homóloga a SEQ ID NO: 38.

49. Un vector de expresión que comprende la molécula aislada de cADN 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 cADN de la reivindicación 48, (ii) el polipéptido codificado por la molécula aislada de cADN de la reivindicación 48, y (iii) una combinación de la molécula aislada de cADN 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 cADN de la reivindicación 48.

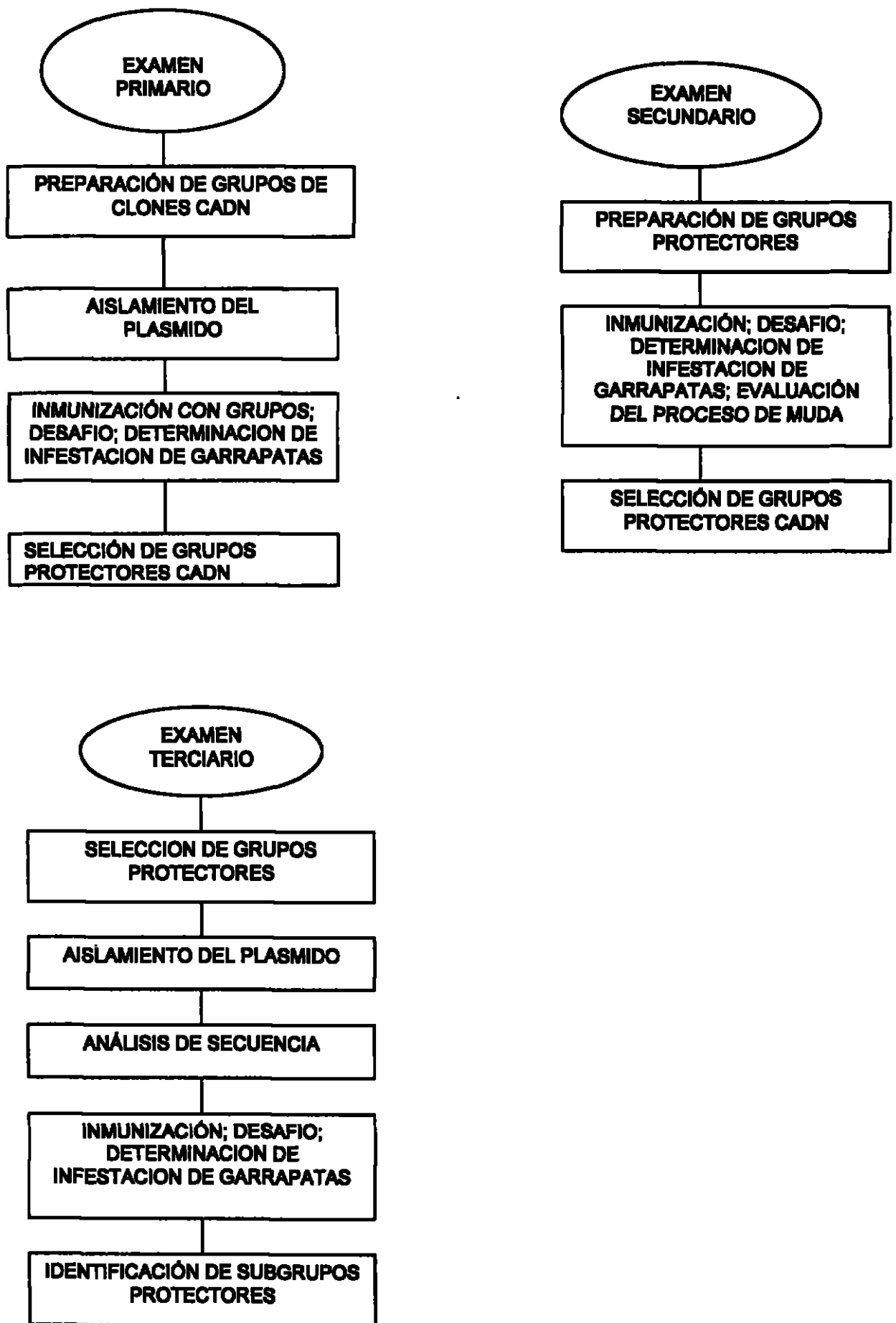
44

EXTRACTO DE LA DIVULGACION

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.

250

FIGURA 1



51

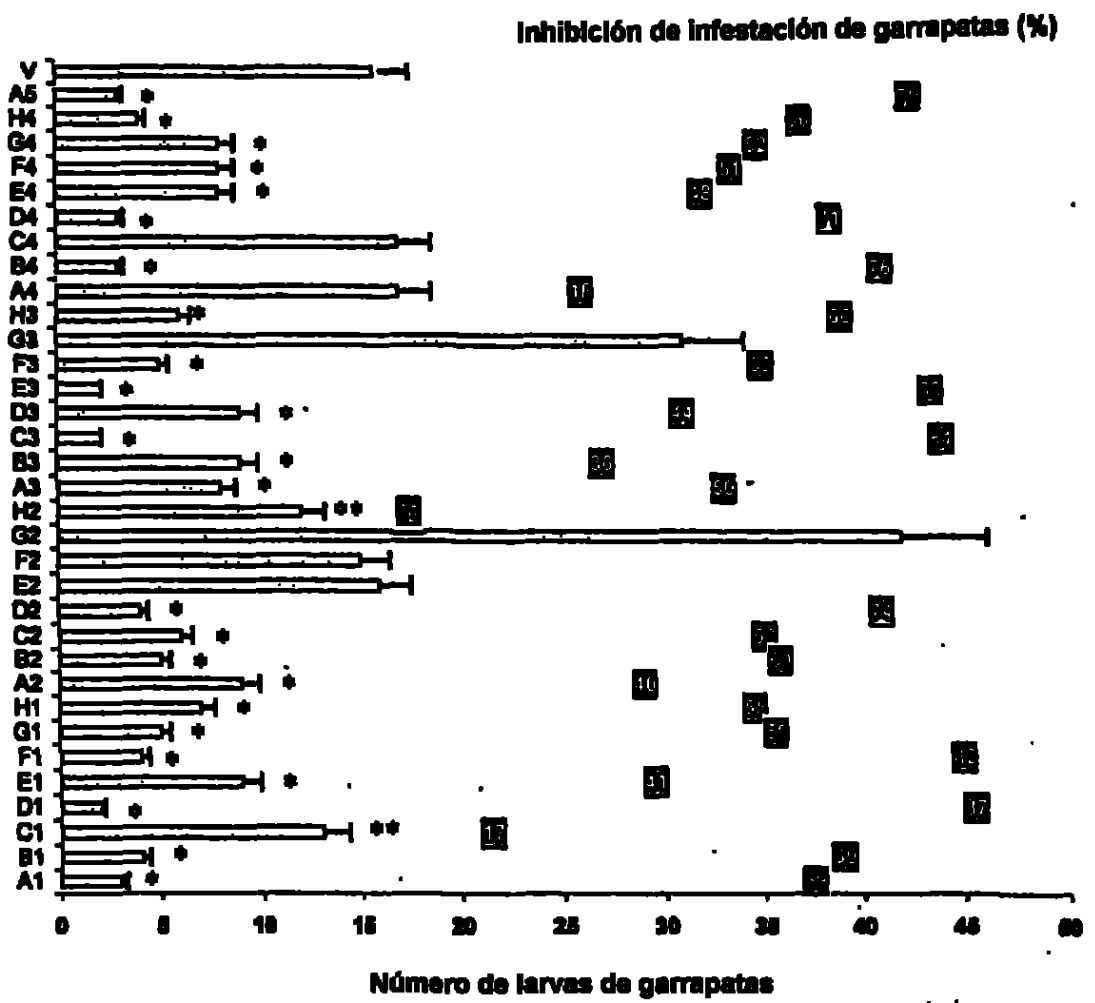


FIG. 2A



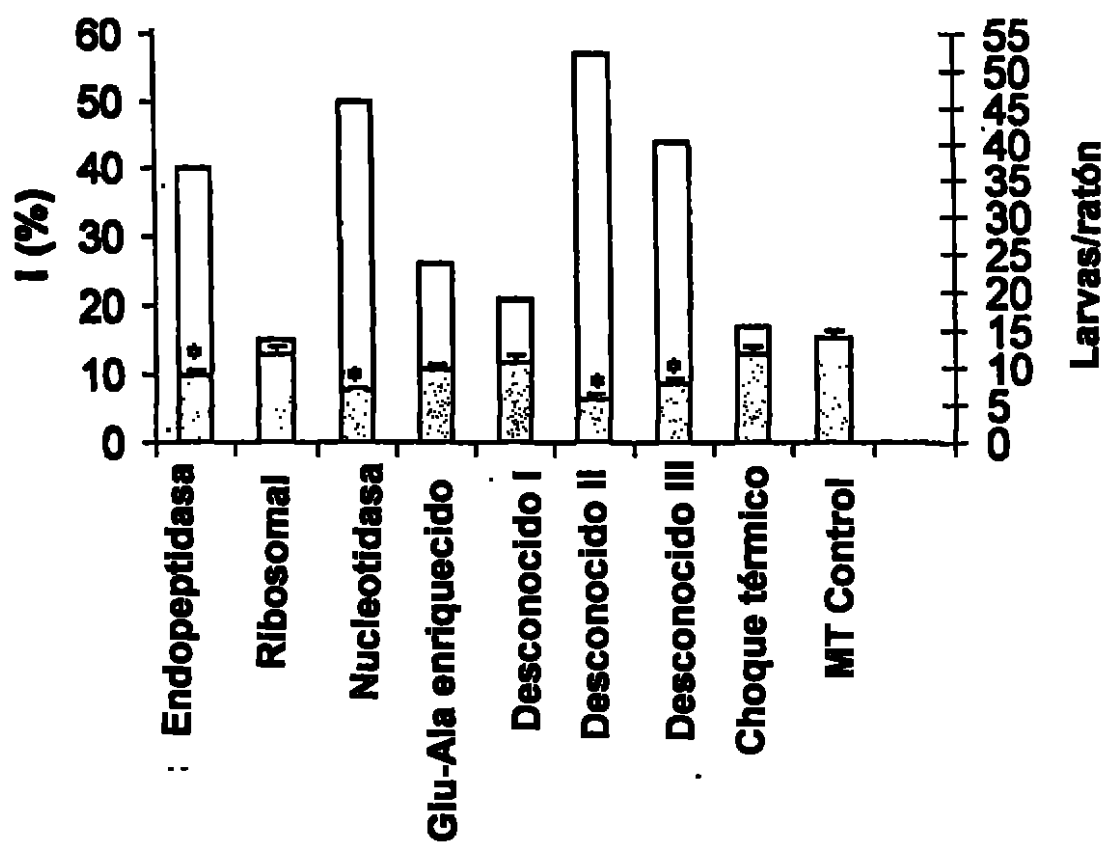


FIG. 3

PATENTE DE INVENCION

USUARIO	RADICADOR
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6
7	7
8	8
9	9
10	10
11	11
12	12
13	13
14	14
15	15
16	16
17	17
18	18
19	19
20	20
21	21
22	22
23	23
24	24
25	25
26	26
27	27
28	28
29	29
30	30
31	31
32	32
33	33
34	34
35	35
36	36
37	37
38	38
39	39
40	40
41	41
42	42
43	43
44	44
45	45
46	46
47	47
48	48
49	49
50	50
51	51
52	52
53	53
54	54
55	55
56	56
57	57
58	58
59	59
60	60
61	61
62	62
63	63
64	64
65	65
66	66
67	67
68	68
69	69
70	70
71	71
72	72
73	73
74	74
75	75
76	76
77	77
78	78
79	79
80	80
81	81
82	82
83	83
84	84
85	85
86	86
87	87
88	88
89	89
90	90
91	91
92	92
93	93
94	94
95	95
96	96
97	97
98	98
99	99
100	100

- | | |
|-----|-----|
| () | () |
| () | () |
| () | () |
| () | () |
| () | () |

✓

()

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

()

11

()

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

()

()

11

**Fecha:**

SS

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO

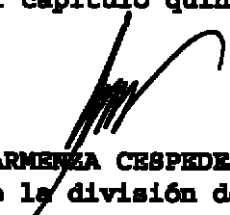
REFERENCIA Radicación No. 5 108673
 Trámite 2
 Evento 1
 Actuación 430
 Oficio No. 11293

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

1. Debe allegar el poder otorgado al abogado que aparece en la solicitud como apoderado, con el lleno de los requisitos exigidos en el Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.
2. Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el(los) inventor(s) al(los) solicitante(s) o a su(s) causante(s) (art. 26-k, Dec 486/2000).
3. Para efectos de la publicación en la gaceta se recomienda allegar el extracto diligenciado.

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMEN CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 01 DIC. 2005
adpa1

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud cuya prioridad se invoca, copia de la misma certificada por la autoridad que la expidió

Continúa en la página siguiente...

56

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 5 108673

y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de éste plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.