

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21 **EXPEDIENTE No**

06-77106

54 **TITULO**

ANTIGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES

POR MULTI ESPECIES DE GARRAPATAS

51 **CLASIFICACION INTERNACIONAL**

71 **SOLICITANTE**

THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY

DOMICILIO

STILLWATER OKLAHOMA 74078 ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74 **APODERADO**

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22 **SANTAFE DE BOGOTA, D C**

PETITORIO

AS: 101.825



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-077106-00000-0000
Fec: 2006-08-04 17:20:02 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 2 PATENTES
Eva: 1 REGDEPOSITO
Act 411 PRESENTACION Falso: 20

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:
E-mail

Fax

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 Jesús de La Fuente, Katherine M. Kocan, Consuelo García-Almazan,
Edmour F. Blouin

Dirección: P.O. Box 1994, Stillwater, OK 74078, US; 3909 E. 92nd Street, Perkins, OK 74059,
US; Prol. Aldama 1424, Trac. La Sierra, Ca. Ucetoria, Tam. CP. 87037, MX; 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
POR MULTI ESPECIES DE GARRAPATAS

6 Clasificación Internacional (51) AGIK 39 / 38 - C07K 14 / 430

7 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

04-08-2005

(31) Número de Solicitud

11/197,133

8 Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:

6 meses ☒

12 meses ☐

18 meses ☐

Otro ☐

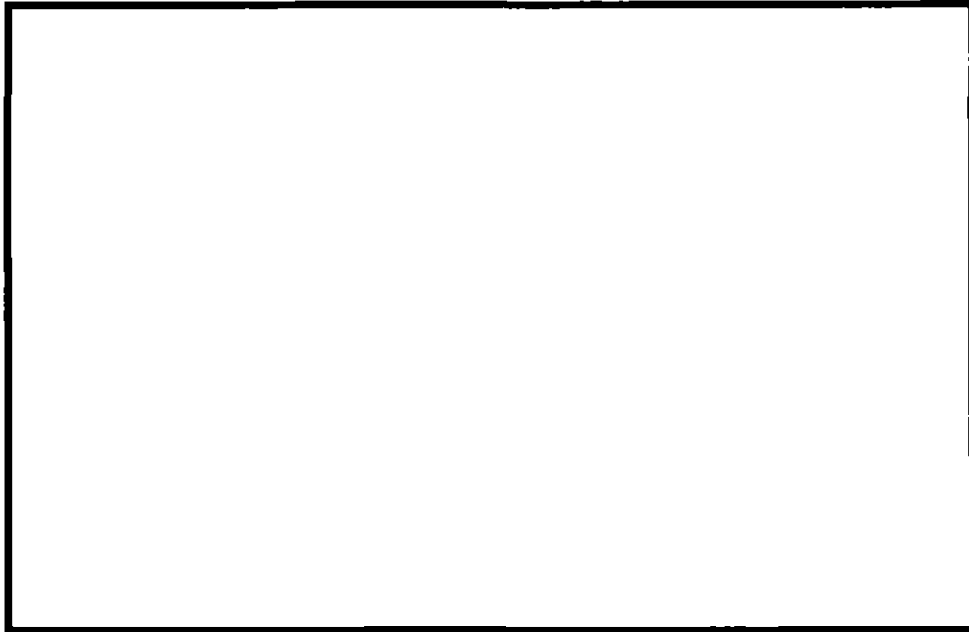
9 Comprobante de pago No. 06-52,707 - 06,57,378

Fecha 04-08-2006

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

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$483.000
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. \$130.000
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Fotocopia Autenticada
- ☐ 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.

73

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 52,707
FECHA : JULIO 12 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rd: 06-077106-00000-0000
FEE 2006-08-04 17:20:02 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 2 PATENTES
Eva: 1 REGDEPOSITO
Adi 411 PRESENTACION
Folios: 60

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	54971425	12/07/2006	13,940,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SUN: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Handwritten mark resembling a stylized 'X' or '4'.

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-077106-00000-0000
Fec: 2006-08-04 17:20:02 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 2 PATENTES
Eva: 1 REGDEPOSITO
Act: 411 PRESENTACION Folios: 60

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 57,378
FECHA : JULIO 28 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	54772668	28/07/2006	35,961,000.00

***** 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	130,000.00
	TOTAL :	\$ 130,000.00

SON: CIENTO TREINTA MIL PESOS

Handwritten signature.

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

f 5

**ANTIGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE
INFESTACIONES DE GARRAPATAS MULTIESPECIES**

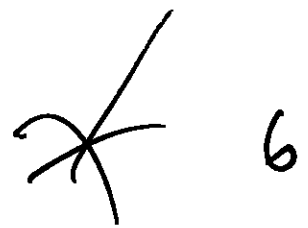
ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo Técnico:

5 La presente invención se relaciona a la
identificación de antígenos protectores contra infestaciones
de garrapatas, secuencias de genes y proteínas codificadas
para tales antígenos, vacunas relacionadas y métodos útiles
para inducir una respuesta inmune en mamíferos, que son
10 protectores contra una amplia gama de especies de garrapatas.
Esta solicitud suplementa su solicitud de origen al
proporcionar datos adicionales, incluyendo secuencias
derivadas de varias especies de garrapatas y cepas,
relacionadas con el antígeno designado 4D8.

15 **Antecedentes:**

Las garrapatas infestan a animales silvestres,
domesticados y a los humanos y transmiten patógenos
incluyendo hongos, bacterias, virus y protozoarios.
Actualmente, las garrapatas se consideran que son el segundo
20 en el mundo a los mosquitos como vectores de enfermedades
humanas, pero que se consideran que son el vector más
importante de patógenos en Norteamérica (Parola y Raoult,
2001). *Ixodes spp.* se distribuyen mundialmente y actúan como
vectores de enfermedades humanas causadas por *Borrelia*
25 *burgdorferi* (enfermedad de Lyme), *Anaplasma phagocytophila*



(ehrliquiosis 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
5 encefalitis transmitida por garrapatas (TBE) y virus de fiebre Hemorrágica Omsk (Estrada-Peña y Jongejan, 1999; Parola y Raoult, 2001). Por todos los Estados Unidos del Este y del Sureste y Canadá, *I. scapularis* (la garrapata de patas negras) es el vector principal de *B. burgdorferi* en el
10 sentido estricto y *A. phagocytophila* (Estrada-Peña y Jongejan, 1999; Parola y Raoult, 2001). Además de *Ixodes*, otras especies de garrapatas de importancia médica y veterinaria incluyen aquellos de los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Boophilus*.

15 El control de infestaciones de garrapatas es difícil y frecuentemente impráctico para garrapatas multi-hospederas tales como *Ixodes spp.* Actualmente, el control de garrapatas se efectúa mediante el manejo integrado de pestes en el cual diferentes métodos de control se adaptan a un área
20 o contra una especie de garrapata con la consideración debida a sus efectos ambientales. El control de las garrapatas mediante vacunación, sin embargo, evitaría la contaminación ambiental y la selección de garrapatas resistentes a fármacos que resultan de la aplicación de acaricida repetida (de la
25 Fuente y colaboradores, 1998; García-García y colaboradores,

1999, de la Fuente y Kocan 2004). Las vacunas anti-garrapatas también permitirían la inclusión de múltiples antígenos con el fin de dirigirse a una amplia gama de especies de garrapatas y para la incorporación de antígenos bloqueadores de patógenos (de la Fuente y Kocan 2004).

Recientemente, se han desarrollado vacunas contra *Boophilus spp.* de un hospedero (Willadsen, 1997; Willadsen y Jongejan, 1999; de la Fuente y colaboradores, 1999; 2000; de Vos y colaboradores, 2001; de la Fuente y Kocan 2004). El antígeno de intestino BM86 de *B. microplus* recombinante incluido en formulaciones de vacunas comerciales TickGARD (Hoechst, Animal Health Australia) y Gavac (Heber Biotec S. A., Havana, Cuba) también confiere protección parcial contra los géneros de garrapatas *Hyalomma* y *Rhipicephalus* filogenéticamente relacionados (de la Fuente y colaboradores, 2000; de Vos y colaboradores, 2001; de la Fuente y Kocan 2004). Sin embargo, la inmunización con BM86 no logró proteger contra el *Amblyomma spp.* más filogenéticamente distante (de Vos y colaboradores, 2001). Estos resultados sugieren que la utilización de Bm86 o un gen estrechamente relacionado para la producción de vacunas contra *Ixodes spp.* u otros géneros de garrapatas filogenéticamente distantes de *Boophilus spp.* (Black y Piesman, 1994) podría ser impráctico. Por lo tanto, permanece una necesidad para identificar candidatos de vacunas de amplia gama contra infestaciones de

g 8

garrapatas a través de especies filogenéticamente distantes (de la Fuente y Kocan 2004).

En la solicitud de prioridad No. de serie 10/425,563 los inventores describieron la identificación
5 mediante ELI y el análisis de secuencia de clones de cDNA protectores contra infestaciones experimentales con *I. Scapularis* en lo que fue el primer ejemplo de la aplicación de ELI a artrópodos y particularmente a garrapatas (Almazán y colaboradores, 2003 a,b). Se pensó que estos antígenos
10 protectores, aunque identificados por *I. scapularis*, podrían ser protectores cruzadamente entre las especies *Ixodes* considerando el alto grado de conservación de las secuencias de genes y la función de proteína entre las especies del mismo género.

15 De manera sorprendente, se ha descubierto que ciertos de los antígenos protectores exhiben actividad y son expresados a través de las especies de garrapatas, y en algunas circunstancias a través de los géneros, haciendo posible de esta manera el uso de estos antígenos comunes en
20 formulaciones de vacunas anti-garrapatas de amplia gama.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

En la solicitud de prioridad No. de Serie 10/425,563, numerosos antígenos protectores derivados de *I. scapularis* se identificaron y mostraron que poseen
25 propiedades protectoras contra las infestaciones de

garrapatas *I. scapularis*. Entre estos antígenos estuvieron los clones y polipéptidos asociados designados 4D8, 4F8 y 4E6. En la solicitud de origen inmediata, la actividad de estos antígenos protectores particulares se demuestra que se
5 extiende a otras especies de garrapatas, y en el caso de 4D8, 4F8 y 4E6 a especies de garrapatas no de *Ixodes*. Además, se proporcionan las secuencias recientemente descubiertas (DNA y proteína) del antígeno 4D8 protector de garrapatas derivado del género *Rhipicephalus*, particularmente *Rhipicephalus*
10 *appendiculatus*. En esta solicitud, se proporcionan secuencias adicionales y datos derivados de otras especies de garrapatas de los géneros *Boophilus*, *Dermacentor*, *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma* y *Haemaphysalis* relacionados con el antígeno designado 4D8, junto con comparaciones de homología.

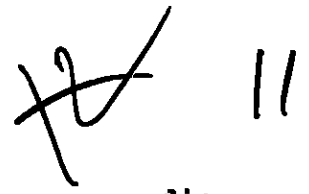
15 La conservación de secuencia y expresión de 4F8, 4D8 y 4E6 se analizaron en las especies relacionadas con *I. scapularis*, *I. pacificus* e *I. ricinus*, y en *D. variabilis*, *R. sanguineus*, *B. microplus* y *A. Americanum* mediante RT-PCR utilizando los cebadores específicos para las secuencias de
20 *I. scapularis* conocidas. 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*. Los genes 4D8 correspondientes *D. variabilis*, *A. Americanum* y
25 *B. microplus* se clonaron y se secuenciaron. En esta

solicitud, datos adicionales en la conservación de secuencia 4D8 se proporcionan en la Tabla 8.

La detección de la expresión 4D8 y 4E6 en especies de garrapatas no de *Ixodes* fueron la base para un experimento en el cual los conejos se inmunizaron con 4F8, 4D8 y 4E6 derivados de *I. scapularis* y se estimularon con las ninfas de *I. scapularis*, *D. variabilis* y *A. Americanum*. Los resultados sustentan la utilización de antígenos protectores inventivos en formulaciones de vacunas para el control de especies de garrapatas múltiples.

Por consiguiente, en una modalidad de la presente invención se proporcionan secuencias de cDNA, fragmentos de codificación de proteína de las mismas, y secuencias de proteína derivadas para los antígenos protectores multi-especies denominados 4F8, 4D8 y 4E6.

En otra modalidad de la presente invención se proporciona una composición de vacuna que comprender las proteínas recombinantes protectoras inventivas y/o cDNAs modificados por separado o que pueden ser opcionalmente combinados con adyuvante para incrementar la eficacia de protección de las preparaciones de vacuna contra múltiples especies de garrapatas, en donde la composición de vacuna además comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición de vacuna también puede ser opcionalmente combinada con componentes de patógenos



transmitidos por garrapatas para proporcionar un medio para controlar las infecciones transmitidas por garrapatas, en donde la composición de vacuna además comprende un portador o diluyente y adyuvante farmacéuticamente aceptable.

5 En otra modalidad de la presente invención se proporciona un método para inducir una respuesta inmune en un mamífero para proporcionar protección inmune, que reduce o afecta las infestaciones por garrapatas objetivo y/o la transmisión de patógenos transmitidos por garrapatas, el
10 método que comprenden administrar a la población de humanos en riesgo y el criadero de mamíferos una cantidad efectiva de una composición de vacuna que comprende las proteínas recombinantes protectoras inventivas y/o cDNAs modificados solos o en combinación con un adyuvante o componentes de
15 patógenos transmitidos por garrapatas para proporcionar un medio para controlar las infestaciones de garrapatas, y para reducir la transmisión a humanos de infecciones transmitidas por garrapatas, en donde la composición de vacuna además comprende un portador o diluyente farmacéuticamente
20 aceptable.

 En otra modalidad de la presente invención se proporciona un polipéptido aislado o composición de vacuna que comprende una o más proteínas recombinantes en donde el polipéptido aislado o una o más proteínas recombinantes es un
25 polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos

mostrada en cualquiera de la SEQ ID No. 52 hasta SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 31, o SEQ ID No. 39 o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 60%, de preferencia por lo menos 70%, adecuadamente por lo menos 80%, adecuadamente por lo menos 90%, adecuadamente por lo menos 99% homóloga con cualquiera de la SEQ ID No. 52 hasta SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 31, o SEQ ID No. 39. La composición de vacuna opcionalmente puede ser combinada con adyuvante para aumentar la eficacia de protección de las preparaciones de vacuna contra múltiples especies de garrapatas, en donde la composición de vacuna además comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición vacuna también puede ser opcionalmente combinada con componentes de patógeno transmitidos por garrapata para proporcionar un medio para controlar las infecciones transmitidas por garrapata, en donde la composición de vacuna además comprende un portador o diluyente y adyuvante farmacéuticamente aceptable.

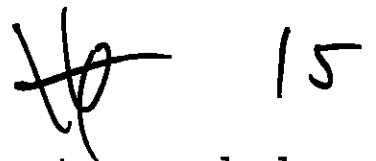
En otra modalidad de la presente invención se proporciona un cDNA que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de la SEQ ID No. 52 hasta SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 31, o SEQ ID No. 39 o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es

por lo menos 60%, de preferencia por lo menos 70%,
adecuadamente por lo menos 80%, adecuadamente por lo menos
90%, adecuadamente por lo menos 99% homóloga con cualquiera
de la SEQ ID No. 52 hasta SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 4, SEQ ID
5 No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 31, o SEQ ID No. 39.

En otra modalidad de la presente invención se
proporciona un método para inducir una respuesta inmune en un
mamífero para proporcionar protección inmune, que reduce o
afecta las infestaciones por garrapatas objetivo y/o la
10 transmisión de patógenos transmitidos por garrapatas, el
método que comprende administrar a la población humana en
riesgo y el criadero de mamíferos una cantidad efectiva de
una composición de vacuna que comprende una o más proteínas
recombinantes en donde la una o más proteínas recombinantes
15 es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos
mostrada en cualquiera de la SEQ ID No. 52 hasta SEQ ID No.
62, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID No.
31, o SEQ ID No. 39 o un polipéptido que comprende una
secuencia de aminoácidos que es por lo menos 60%, de
20 preferencia por lo menos 70%, adecuadamente por lo menos 80%,
adecuadamente por lo menos 90%, adecuadamente por lo menos
99% homóloga con cualquiera de la SEQ ID No. 52 hasta SEQ ID
No. 62, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID
No. 31, o SEQ ID No. 39 sola o en combinación con un
25 adyuvante o componentes de patógeno transmitidos por

garrapatas para proporcionar un medio para controlar infestaciones de garrapatas y para reducir la transmisión a humanos de infecciones transmitidas por garrapatas, en donde la composición de vacuna además comprende un portador o
5 diluyente farmacéuticamente aceptable.

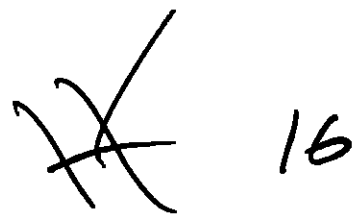
En otra modalidad de la presente invención se proporciona un método para inducir una respuesta inmune a un mamífero para proporcionar protección inmune, que reduce o afecta las infestaciones por garrapatas objetivo y/o la
10 transmisión de patógenos transmitidos por garrapatas, el método que comprende administrar a la población humana en riesgo y criadero de mamíferos una cantidad efectiva de un cDNA que codifica uno o más polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de la SEQ ID
15 No. 52 hasta SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 31, o SEQ ID No. 39 o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 60%, de preferencia por lo menos 70%, adecuadamente por lo menos 80%, adecuadamente por lo menos 90%, adecuadamente
20 por lo menos 99% homóloga con cualquiera de la SEQ ID No. 52 hasta SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 31, o SEQ ID No. 39 sola o combinación con un adyuvante o componentes de patógenos transmitidos por garrapatas para proporcionar un medio para controlar
25 infestaciones de garrapatas y para reducir la transmisiones a



humanos de infecciones o transmitidas por garrapatas, en donde la composición de vacuna además comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se relaciona al uso de un
5 polipéptido aislado o composición de vacuna que comprende una
o más proteínas recombinantes en donde el polipéptido aislado
o una o más proteínas recombinantes es un polipéptido que
comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera
de la SEQ ID No. 52 hasta SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 4, SEQ ID
10 No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 31, o SEQ ID No. 39 o un
polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es
por lo menos 60%, de preferencia por lo menos 70%,
adecuadamente por lo menos 80%, adecuadamente por lo menos
90%, adecuadamente por lo menos 99% homóloga con cualquiera
15 de la SEQ D No. 52 hasta SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 4, SEQ ID
No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 31, o SEQ ID No. 39 en la
manufactura para un medicamento para controlar infestaciones
de garrapatas y para reducir la transmisión a humanos de
infecciones transmitidas por garrapatas.

20 La presente invención se relaciona al uso de un
cDNA que codifica uno o más polipéptidos que comprende una
secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de la SEQ ID
No. 52 hasta SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 27, SEQ
ID No. 29, SEQ ID No. 31, o SEQ ID No. 39 o un polipéptido
25 que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo



menos 60%, de preferencia por lo menos 70%, adecuadamente por lo menos 80%, adecuadamente por lo menos 90%, adecuadamente por lo menos 99% homóloga con cualquiera de la SEQ ID No. 52 hasta SEQ ID No. 62, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 31, o SEQ ID No. 39 en la manufactura de un medicamento para controlar infestaciones de garrapatas y para reducir la transmisión a humanos de infecciones transmitidas por garrapatas.

En una modalidad de preferencia el polipéptido de acuerdo con la presente invención es aquel definido en la SEQ ID No. 52.

En una modalidad de preferencia el polipéptido de acuerdo con la presente invención es aquel definido en la SEQ ID No. 53.

En una modalidad de preferencia el polipéptido de acuerdo con la presente invención es aquel definido en la SEQ ID No. 54.

En una modalidad de preferencia el polipéptido de acuerdo con la presente invención es aquel definido en la SEQ ID No. 55.

En una modalidad de preferencia el polipéptido de acuerdo con la presente invención es aquel definido en la SEQ ID No. 56.

En una modalidad de preferencia el polipéptido de acuerdo con la presente invención es aquel definido en la SEQ

17

ID No. 57.

En una modalidad de preferencia el polipéptido de acuerdo con la presente invención es aquel definido en la SEQ ID No. 58.

5 En una modalidad de preferencia el polipéptido de acuerdo con la presente invención es aquel definido en la SEQ ID No. 59.

10 En una modalidad de preferencia el polipéptido de acuerdo con la presente invención es aquel definido en la SEQ ID No. 60.

En una modalidad de preferencia el polipéptido de acuerdo con la presente invención es aquel definido en la SEQ ID No. 61.

15 En una modalidad de preferencia el polipéptido de acuerdo con la presente invención es aquel definido en la SEQ ID No. 62.

Un mejor entendimiento de la presente invención y sus objetos y ventajas llegarán a ser evidentes para aquellos expertos en esta técnica a partir de la siguiente descripción detallada, en donde se describe solamente la modalidad preferida de la invención, simplemente a manera de ilustración del mejor modo contemplado para llevar a cabo la invención. Como será comprendido, la invención es capaz de modificaciones en varios aspectos obvios, todos sin apartarse del alcance y espíritu de la invención. Por consiguiente, la

20

25

descripción debe ser considerada como de naturaleza ilustrativa y no como restrictiva.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es un resumen del procedimiento ELI de
5 cDNA utilizado para identificar antígenos protectores contra infestaciones de *I. scapularis*.

La FIG. 2A es una gráfica que representa los resultados de una clasificación o detección primaria de acumulaciones de cDNA (A-H 1-4, A5) mediante ELI. V, ratones
10 de control inyectados con 1 µg de DNA de vector solo. $*\alpha < 0.10$, $**\alpha < 0.05$ (prueba *post-hoc* de Tukey para comparaciones de pares después de ANOVA). Los números en cuadro representan los valores para la inhibición de infestación de garrapatas con respecto al grupo de control.

15 La FIG. 2B es una gráfica que representa los resultados de una clasificación primaria de acumulaciones de cDNA (A6-A10, B-H 5-8) mediante ELI. V, ratones de control inyectados con 1 µg de DNA de vector solo. $*\alpha < 0.01$, $**\alpha < 0.05$ (prueba de *post-hoc* de Tukey para comparaciones de pares
20 después de ANOVA). Los números en cuadro representan valores para inhibición de infestación de garrapatas con respecto al grupo de control.

La FIG. 3 es una gráfica que representa los resultados de una clasificación terciaria mediante ELI de
25 sub-acumulaciones de cDNA formadas de acuerdo con la función

predicha de proteínas codificadas. Solamente los grupos con $I \geq 15\%$ son mostrados (barras blancas). El número de larvas engordadas por ratón se expresa como $media \pm SD$ (barras negras). Los ratones del control se inyectaron con cDNAs
5 mitocóndricos (MT). * $P \leq 0.05$ (prueba T del Estudiante).

IDENTIDAD DE SECUENCIA U HOMOLOGIA DE SECUENCIA

La presente invención también comprende el uso de secuencias que tienen un grado de identidad de secuencia u homología de secuencia con secuencia(s) de aminoácidos de un
10 polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifica tal polipéptido (después en la presente referido como "secuencia(s) homóloga(s)"). Aquí, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una cierta homología con las
15 secuencias de aminoácidos presentes y las secuencias de nucleótidos presentes. Aquí, el término "homología" puede ser igualado con "identidad".

La secuencia de aminoácidos homóloga y/o secuencia de nucleótidos debe proporcionar y/o codificar un polipéptido
20 que retiene la actividad funcional y/o aumenta la actividad de la enzima.

En el presente contexto, una secuencia homóloga se toma que incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser por lo menos 75, 85 o 90% idéntica, de preferencia por lo
25 menos 95 o 98% idéntica a la secuencia presente. Típicamente,

A

20

los homólogos comprenderán los mismos sitios activos etc. como la secuencia de aminoácidos presente. Aunque la homología también puede ser considerada en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

En el presente contexto, una secuencia homóloga se toma para incluir una secuencia de nucleótidos que puede ser por lo menos 75, 85 o 90% idéntica, de preferencia por lo menos 95 o 98% idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención (la secuencia presente). Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican para los sitios activos etc. como la secuencia presente. Aunque la homología también puede ser considerada en términos de similitud (es decir residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología pueden ser conducidas a simple vista, o más usualmente, con ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas de computadora comercialmente disponibles pueden calcular el % de homología entre dos o más

21

secuencias.

El % de homología puede ser calculado sobre las secuencias contiguas, es decir una secuencia es alineada con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia es directamente comparado con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo a la vez. Esto es llamado una alineación "no espaciada". Típicamente, tales alineaciones no espaciadas se realizan solamente sobre un número relativamente corto de residuos.

Aunque este es un método muy simple y consistente, éste no logra tomar en consideración que, por ejemplo, en un par idéntico de otra manera de secuencias, una inserción o supresión causará que los siguientes residuos de aminoácidos sean colocados fuera de la alineación, dando por resultado potencialmente de esta manera en una reducción grande en % de homología cuando una alineación global se realiza. Consecuentemente, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineaciones óptimas que toman en consideración posibles inserciones y supresiones sin sancionar indebidamente el registro de homología total. Esto se logra al insertar "espacios" en la alineación de secuencia para tratar de maximizar la homología local.

Sin embargo, éstos métodos más complejos asignan "sanciones de espacio" a cada espacio que ocurre en la alineación de modo que, para el mismo número de aminoácidos

27

22

idénticos, una alineación de secuencia con tan pocos espacios como posible - reflejando más alta capacidad de relación entre las dos secuencias comparadas - logrará un registro más alto que uno con muchos espacios. Los "costos de espacio de afinación" típicamente se utilizan de modo que cargan un costo relativamente alto para la existencia de un espacio y una sanción más pequeña para cada residuo subsecuente en el espacio. Esto es el sistema de registro de espacio más comúnmente utilizado. Las altas sanciones de espacio por supuesto producirán alineaciones optimizadas con menos espacios. La mayoría de los programas de alineación permitirán que las sanciones de espacio sean modificadas. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores de error cuando se utiliza tal software para comparaciones de secuencia. Por ejemplo cuando se utiliza el paquete Bestfit de Wisconsin GCG la sanción de espacio de error para las secuencias de aminoácidos es -12 para un espacio y -4 para cada extensión.

El cálculo de % de homología máximo por lo tanto en primer lugar requiere la producción de una alineación óptima, tomando en consideración las sanciones de espacio. Un programa de computadora adecuado para el llevar a cabo tal alineación es el paquete Bestfit de Wisconsin GCG (Devereux y colaboradores, 1984 Nuc. Acids Research 12 p387). Ejemplos de otro software que pueden realizar comparaciones de secuencia incluyen, pero no están limitados a, el paquete BLAST (ver

Ausubel y colaboradores, 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Edición - Capítulo 18), FASTA (Altschul y colaboradores, 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y el sitio GENEWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como
5 FASTA están disponibles para la búsqueda fuera de línea y en línea (ver Ausubel y colaboradores, 1999, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere utilizar el programa Bestfit GCG. Una nueva herramienta, llamada, BLAST 2 Sequences también esta disponible para
10 comparar proteína y secuencias de nucleótidos (ver FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Aunque el % de homología final puede ser medido en términos de identidad, el proceso de alineación mismo
15 típicamente no está basado en una comparación de todos o nada de pares. En cambio, una matriz registro de la similitud escalada generalmente es utilizada de modo que asigna registros a cada comparación emparejada basada en la similitud química o la distancia evolucionaria. Un ejemplo de
20 tal matriz comúnmente utilizada es la matriz BLOSUM62 - la matriz de error para el sitio BLAST de programas. Los programas GCG Wisconsin generalmente usan ya sea los valores de error públicos o una tabla de comparaciones de símbolos usuales si es suministrada (ver el manual del usuario para
25 detalles adicionales). Para algunas aplicaciones, es

24

preferible utilizar los valores de error públicos para el paquete GCG, o en el caso de otro software, la matriz de error, tal como BLOSUM62.

Alternativamente, el porcentaje de homología se puede calcular utilizando la característica de alineación múltiple en DNASIS™ (Hitachi Software), basado en un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

Una vez que el software ha producido una alineación óptima, es posible calcular el % de homología, de preferencia el % de identidad de secuencia. El software típicamente hace esto como parte de la comparación de secuencia y genera un resultado numérico.

Si se utilizan sanciones de espacio cuando se determina la identidad de secuencia, entonces de preferencia los siguientes parámetros son utilizados:

PARA BLAST	
ABERTURA DE ESPACIO	0
EXTENSION DE ESPACIO	0

PARA CLUSTAL	DNA	PROTEINA	
TAMAÑO DE PALABRA	2	1	K triple
SANCION DE ESPACIO	10	10	
EXTENSION DE ESPACIO	0.1	0.1	

En un aspecto preferible de la presente invención

el siguiente software y los ajustes para el cálculo del porcentaje de homología/identidad son utilizados. Para secuencias de aminoácidos los porcentajes de identidad (homología) o "positivo" se calculan mediante el AlignX
5 VectorNTI (Vector NTI Advance 9.1 de Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, EUA.), para cada par posible de secuencias de aminoácidos los ajustes son los parámetros de error (Sanción de abertura - 10, Sanción de extensión de espacio 0.1).

10 Las secuencias también pueden tener supresiones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan por resultado una sustancia funcionalmente equivalente. Las sustituciones de aminoácidos, deliberada se puede hacer en la base de
15 similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza antipática de los residuos mientras que se retenga la actividad de enlace secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos negativamente cargados incluye ácido aspártico y
20 ácido glutámico; los aminoácidos positivamente cargados incluye lisina y arginina; y aminoácidos con grupos de extremo polar no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similares incluye leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina,
25 fenilalanina y tirosina

~~27~~ 26

Las sustituciones conservativas se pueden hacer, por ejemplo de acuerdo con la Tabla enseguida. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y de preferencia en la misma línea y en la tercera columna pueden ser sustituidos entre sí:

ALIFATICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar - no cargado	C S T M
		N Q
	Polar - cargado	D E
		K R
AROMATICO		H F W Y

La presente invención también comprende la sustitución homóloga (sustitución y reemplazo son ambos utilizados en la presente para dar a entender el intercambio de un residuo de aminoácido existente, con un residuo alternativo) que puede ocurrir, es decir, sustitución semejante por semejante tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar etc. La sustitución no homóloga también puede ocurrir es decir de una clase de residuo a otro o alternativamente involucrando la inclusión de aminoácidos no naturales tal como ornitina (después en la presente referido como Z), ornitina de ácido diaminobutírico (después en la presente referido como B), ornitina de norleucina (después en la presente referido como O), piriilalanina,

tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Los reemplazos también se pueden hacer mediante aminoácidos no naturales.

Las secuencias de aminoácidos variantes pueden
5 incluir grupos espaciadores adecuados que pueden ser
insertados entre cualquiera de dos residuos de aminoácido de
la secuencia incluyendo grupos alquilo tales como grupos
metilo, etilo o propilo además de espaciadores de aminoácidos
tales como residuos de glicina o β -alanina. Una forma
10 adicional de variación, involucra la presencia de uno o más
residuos de aminoácidos en forma peptoide, que será bien
entendida por aquellos expertos en la técnica. Para evitar
duda, "la forma peptoide" se utiliza para referirse a
residuos de aminoácidos variantes en donde el grupo de
15 sustituyente α -carbono está en el átomo de nitrógeno del
residuo antes que el α -carbono. Los procesos para preparar
péptidos en la forma peptoide son conocidos en la técnica,
por ejemplo Simon RJ y colaboradores, PNAS (1992) 89(20),
9367-9371 y Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4),
20 132-134.

Las secuencias de nucleótidos para la presente
invención o que codifican un polipéptido que tiene las
propiedades específicas definidas en la presente pueden
incluir dentro de estas nucleótidos sintéticos o modificados.
25 Un número de tipos diferentes de modificación a

oligonucleótidos son conocidos en la técnica. Estos incluyen cadenas principales de metilfosfonato y fosforotioatos y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los propósitos la presente invención se va a entender que las secuencias de nucleótidos descritas en la presente pueden ser modificadas mediante cualquier método disponible en la técnica. Tales modificaciones se pueden llevar a cabo con el fin de aumentar la actividad *in vivo* o el lapso de vida de las secuencias de nucleótidos.

La presente invención también comprende el uso de secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias discutidas en la presente, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de la misma entonces esa secuencia puede ser utilizada como una sonda para identificar secuencias de codificación similares en otros organismos, etc.

Los polinucleótidos que no son 100% homólogos a las secuencias de la presente invención pero que caen dentro del alcance de la invención se pueden obtener en un número de maneras. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente se pueden obtener por ejemplo mediante el sondeo de librerías de DNA hechas de una gama de individuos, por ejemplo individuos de diferentes poblaciones. Además, otros

homólogos virales/bacterianos o celulares particularmente
homólogos celulares encontrados en células mamíferas (por
ejemplo, rata, ratón, bovino y células de primates), se
pueden obtener y tales homólogos y fragmentos de los mismos
5 en general serán capaces de hibridar selectivamente a las
secuencias mostradas en el listado de secuencias en la
presente. Tales secuencias se pueden obtener mediante el
sondeo de librerías de cDNA hechas de librerías de DNA
genómicas de otras especies de animales y el sondeo de tales
10 librerías con sondas que comprenden todo o parte de
cualquiera de las secuencias en los listados de secuencias
adjuntas bajo condiciones de severidad media a alta. Las
consideraciones similares aplican a la obtención de homólogos
de especies y variantes alélicas del polipéptido o secuencias
15 de nucleótidos de la invención.

Las variantes y homólogos de cepas/especies también
pueden ser obtenidas utilizando el PCR degenerado que
utilizará cebadores diseñados para secuencias objetivo dentro
de las variantes y homólogos que codifican secuencias de
20 aminoácidos conservadas dentro de las secuencias de la
presente invención. Las secuencias conservadas pueden ser
predichas, por ejemplo, al alinear las secuencias de
aminoácidos de varias variantes/homólogos. Las alineaciones
de secuencia se pueden realizar utilizando el software de
25 computadora conocido en la técnica, por ejemplo el programa



PileUp de Wisconsin GCG es ampliamente utilizado.

Los cebadores utilizados en la PCR degenerada contendrá uno o más posiciones degeneradas y será utilizada como condiciones de severidades menores que aquellas
5 utilizadas para clonar secuencias con cebadores de secuencias individuales contra secuencias conocidas.

Alternativamente, tales polinucleótidos se pueden obtener mediante la mutagénesis dirigida al sitio de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil donde por
10 ejemplo los cambios de secuencia de codón silenciosos son requeridos para optimizar preferencias de codones para una célula hospedera particular en la cual están siendo expresadas las secuencias de polinucleótido. Otros cambios de secuencias pueden ser deseados con el fin de introducir
15 sitios de reconocimientos de polipéptidos de restricción, o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

Los polinucleótidos (secuencias de nucleótidos) de la invención se pueden utilizar para producir un cebador, por
20 ejemplo un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda por ejemplo marcada con una marca de revelación por medios convencionales utilizando marcas radioactivas o no radiactivas, o los polinucleótidos pueden ser clonados en vectores. Tales cebadores, sondas y
25 otros fragmentos por lo menos 15, de preferencia por menos

31

20, por ejemplo por lo menos 25, 30 o 40 nucleótidos en longitud, y también están comprendidos por el término polinucleótido de la invención como se utiliza en la presente.

5 Los polinucleótidos tales como polinucleótidos de DNA y sondas de acuerdo con la invención se pueden producir recombinantemente, sintéticamente o por cualquier medio disponible para aquellos expertos en la técnica. Ellos también pueden ser clonados mediante técnicas estándares.

10 En general, los cebadores serán producidos por medio sintéticos, involucrando una manufactura gradual de la secuencia de ácido nucleico deseada de un nucleótido a la vez. Las técnicas para realizar esto utilizando técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la técnica.

15 Los polinucleótidos más largos generalmente serán producidos utilizando medios recombinantes, por ejemplo utilizando las técnicas de clonación de PCR (reacción en cadena de polimerasa). Esto involucrará hacer un par de cebadores (por ejemplo de aproximadamente 15 a 30
20 nucleótidos) que flanquean una región de la secuencia de dirección de lípido que se desea clonar, llevar los cebadores en contacto con mRNA o cDNA obtenido de una célula animal o humana, realizar una reacción en cadena de polimerasa bajo condiciones que dan origen a la amplificación de la región
25 deseada, aislar el fragmento purificado (por ejemplo,

purificar la mezcla de reacción en un gel (de agarosa) y al recuperar el DNA amplificado. Los cebadores pueden ser diseñados para contener sitios de reconocimiento de enzima de restricción adecuados de modo que el DNA amplificado puede ser clonado en un vector de clonación adecuado.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Antes de explicar la presente invención en detalle, es importante entender que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de la construcción ilustrada y las etapas descritas en la presente. La invención es capaz de otras modalidades y de ser practicada o llevada a cabo en una variedad de maneras. Se va a entender que la fraseología y terminología empleadas en la presente es para el propósito de descripción y no de limitación.

En la solicitud de origen, se proporcionan 25 secuencias separadas y distintas que comprenden 14 moléculas de cDNA clonadas y 11 secuencias de aminoácidos deducidas de polipéptidos codificados, las secuencias que se han aislado e identificado como protectoras contra *I. scapularis* de acuerdo con la siguiente metodología experimental descrita.

Ejemplo 1: Construcción de una librería de cDNA de I. scapularis y clasificación para antígenos protectores mediante ELI

Células de garrapata

Monocapas de células IDE8 (ATCC CRL 1973),

33

33

originalmente derivadas de *I. scapularis* embrionario, se mantuvieron a 31°C en el medio L-15B suplementado con suero bovino fetal al 5%, caldo de fosfato de triptosa y concentrado de lipoproteína bovina después Munderloh y colaboradores, (1994). Las células se subcultivaron en 1:5 - 1:10 cuando las monocapas alcanzaron una densidad de aproximadamente 10^7 células/matraz T-25. El medio se reemplazó cada semana.

Construcción de la librería

Una librería de expresión de cDNA se construyó en el vector pEXP1 que contiene el promotor CMV_{IR} de citomegalovirus fuerte (Clontech). Debido a que los inventores planearon dirigir las etapas larvales tempranas de *I. scapularis*, los inventores seleccionaron construir su librería del RNA poly(A)+ derivado de células IDE8 de *I. scapularis* embrionario cultivadas. La librería de cDNA contuvo 4.4×10^6 clones independientes de un título de aproximadamente 10^{10} cfu/ml con más 93% de los clones con insertos de cDNA. El tamaño de cDNA promedio fue de 1.7 kb (0.5-4.0 kb).

Clasificación o Detección primaria

El esquema total para la identificación de antígenos protectores a través de ELI, el fraccionamiento de secuencias y el análisis de secuencia se muestra en la Fig. 1.

24

Noventa seis placas de LBA (maestra) que contiene un promedio de 41 clones de cDNA (30-61) por placa se prepararon. Se hicieron replicas y los clones de cada placa se acumularon, se inocularon en Luria-Bertani con 50 µg/ml de ampicilina, se cultivaron durante 2 hr en una placa de 96 cavidades y el DNA de plásmido se purificó de cada acumulación (sistema de purificación de DNA de plásmido Wizard SV 96, Promega, Madison, WI, EUA). Ratones hembras BALB/c, 5-6 semanas de edad en el momento de la primera vacunación, se utilizaron. Los ratones se cuidaron de acuerdo con los estándares expuestos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Los ratones se inyectaron con una jeringa de tuberculina de 1 ml y una aguja de calibre 27 en los días 0 y 14. Tres ratones por grupo cada uno se inmunizaron IM en el muslo con 1 µg DNA/dosis en 50 µl de PBS. Dos grupos de tres ratones cada uno se incluyeron como controles. Un grupo se inyectó con 1 µg de DNA de vector solo y el segundo con solución salina solamente. Dos semanas después de la última inmunización, los ratones se infestaron con 100 larvas de *I. scapularis* por ratón. Las garrapatas se criaron artificialmente en la instalación de criadero de garrapatas de la Universidad del Estado de Oklahoma al alimentar las larvas sobre los ratones, ninfas sobre conejos y adultos en ovejas y al utilizar para la infestación en los experimentos de los inventores las larvas obtenidas de los

huevecillos ovipositados por una sola hembra. Doce horas después de la infestación de garrapatas, las larvas que no se unieron se contaron para calcular el número de larvas unidas por ratón y los ratones se transfirieron a nuevas jaulas. La caída de larvas se repleta de cada ratón se recolectó diariamente y se contaron durante 7 días. La inhibición de la infestación de garrapatas (I) para cada grupo de prueba se calculó con respecto a los controles inmunizados con vector como $[1 - \frac{n}{c} \times \frac{ic}{in}] \times 100$, 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 por grupo de control, ic es el número promedio de larvas unidas por ratón por grupo de control, y in es el número promedio de larvas unidas por ratón para cada grupo de prueba.

Las acumulaciones de 41 clones de cDNA de *I. scapularis* (30-61) se clasificaron mediante ELI. Solamente 33 acumulaciones de cDNA y los controles se analizaron por experimento. El nivel de infestación de garrapatas promedio fue 50 ± 13 y 56 ± 15 y 56 ± 15 y 54 ± 18 larvas/ratón para ratones inmunizados con cDNA y de control, respectivamente ($P > 0.05$) (Tabla 1). El número promedio de larvas engordadas recuperadas por ratón fue 9 ± 3 y 13 ± 4 en los ratones inmunizados con cDNA y 16 ± 4 y 17 ± 3 en el grupo inmunizado con el vector de control ($P < 0.05$) (Tabla 1). No se observó

3X

36

reducción en el número de larvas recolectadas de los ratones que recibieron el DNA de vector comparado con los controles inmunizados con solución salina. El número máximo de larvas engordadas se recolectó 3 a 4 días después de la infestación.

5 Sin embargo, en los ratones inmunizados con acumulaciones de cDNA B5, A8 y A10 (Fig. 2) se registró un retardo de desarrollo larval en 1 a 2 días. La inhibición promedio de la infestación de garrapatas (I) fue $49 \pm 28\%$ y $30 \pm 22\%$ (Tabla 1). Después de dos experimentos que cubren el análisis de 66

10 acumulaciones (2705 clones), 9 acumulaciones protectoras (351 clones) se seleccionaron produciendo una inhibición de la infestación de garrapatas $1 \geq 60\%$ (Fig. 2A y 2B en la Tabla 1). Cuando los inventores iniciaron estos experimentos, los inventores planearon clasificar arriba de 4000 clones de cDNA

15 considerando la complejidad del genoma de la garrapata. Sin embargo, para su sorpresa 9 acumulaciones de cDNA protectoras se identificaron después de la clasificación de 66 acumulaciones que contienen 2705 clones de cDNA. Este resultado probablemente refleja la posibilidad de interferir

20 con las infestaciones de garrapatas en muchos niveles diferentes que involucran un sin número de productos de genes. Los resultados de los experimentos de vacunación contra garrapatas empleando antígenos recombinantes sustentan esta visión (revisado por Mulenga y colaboradores, 2000).

25 Debido a la complejidad del procedimiento de clasificación en

37

ratones vacunados y estimulados con larvas de garrapatas, fue difícil trabajar con más de 9 acumulaciones de cDNA protectoras. Por lo tanto los inventores no continuaron clasificando nuevas acumulaciones de cDNA y enfocaron su
5 atención en las 9 acumulaciones seleccionadas después de la clasificación primaria.

Clasificación secundaria

La clasificación secundaria se hizo para verificar la capacidad protectora de las acumulaciones de cDNA
10 seleccionada después de la clasificación primaria (Fig. 2A y 2B). Después de la clasificación primaria de 66 acumulaciones de cDNA (2705 clones), 9 acumulaciones con $I_{\geq 60\%}$ se seleccionaron para la clasificación secundaria (re-clasificación) empleando 5 ratones por grupo como es
15 descrito en lo anterior. Las larvas engordadas se conservaron para la muda en una atmósfera de humedad de 95%. La muda de las larvas engordadas se evaluó mediante el examen visual de las ninfas de garrapatas bajo un estereomicroscopio 34 días después de la última recolección larval. La inhibición de
20 muda (M) para cada grupo de prueba se calculó con respecto a los controles inmunizados con 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
25 de control y RL_i el número de larvas recuperadas para cada

grupo de prueba. Los ratones de control se inmunizaron con la acumulación de cDNA F2 negativa (I=0%) o solución salina solamente. Se incluyó un grupo inmunizado con SC con dosis de 100 µg de proteínas de células de garrapata IDE8 totales por 5 dosis en el adyuvante incompleto de Freund.

Todas las 9 acumulaciones de cDNA protectoras dieron resultados positivos en la clasificación secundaria (datos no mostrados). Los niveles de infestación de garrapatas fueron más altos en este experimento (promedio 10 85±6 y 84±3 larvas/ratón para ratones inmunizados con cDNA y de control, respectivamente; $P>0.05$). No obstante, el número promedio de larvas engordadas recuperadas por ratón fue 39±7 y 26±6 para ratones de control y ratones inmunizados con cDNA, respectivamente ($P<0.05$). El grupo inmunizado con las 15 proteínas de célula de garrapatas IDE8 totales se protegió con I=33%. Nuevamente, no se observó reducción en el número de larvas recolectadas de ratones que recibieron el cDNA de control (acumulación negativa F2 después de la clasificación primaria; Fig. 2A) comparada con los controles inmunizados 20 con solución salina.

En la clasificación secundaria, la muda de las larvas engordadas se evaluó después 34 días. La muda se efectuó en todo excepto un grupo inmunizado con cDNA de prueba. La inhibición de la muda en los ratones inmunizados 25 con cDNA de prueba comparado con el grupo inmunizado con cDNA

~~40~~

39

de control varió 0% a 12% de ($6 \pm 4\%$). La inhibición de la muda fue más alta que 50% solamente en las larvas recolectadas de ratones inmunizados con acumulaciones de cDNA B5 y A10, que mostraron un retardo del desarrollo larval en 1 a 2 días en la clasificación primaria. No se observaron diferencias entre el cDNA de control y los ratones inmunizados con solución salina. Entre las larvas que no mudaron a ninfa, algunas fueron visiblemente dañadas y presentaron una coloración roja fuerte. El por ciento de larvas rojas en los ratones inmunizados con cDNA varió entre 3% a 18% ($7 \pm 5\%$) mientras que en los grupos de solución salina e inmunizados con cDNA de control las larvas rojas representaron el 6% y 4%, respectivamente.

Clasificación terciaria

Para la clasificación terciaria, 64 clones se agruparon en 16 sub-acumulaciones cada uno que contiene 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 conjuntamente) y se utilizaron con 4 sub-acumulaciones que contienen 182 clones de función no conocida o con secuencias sin homología a bases de datos de secuencias para inmunizar 4 ratones por grupo. Los ratones se inmunizaron con 0.3 μg /plásmido/dosis en 50 μl de PBS y se evaluaron como es descrito en lo anterior. Los ratones de control se inmunizaron con una

acumulación de 20 plásmidos que contienen cDNAs mitocondríco.

Los niveles de infestación de garrapatas fueron similares en todos los grupos de prueba (72 ± 2 larvas/ratón) y en los grupos de control (69 ± 2 larvas/ratón) ($P > 0.05$). El
5 número de larvas engordadas recuperadas por ratón también fue similar entre los ratones de prueba (16 ± 7) y de control (14 ± 6) ($P > 0.05$). Sin embargo, los grupos inmunizados con sub-acumulaciones de cDNA que contienen clones con endopeptidasa putativa, nucleotidasa, proteínas ribosomales,
10 proteínas de choque térmico, proteínas ricas en glutamina-alanina y 3 de las sub-acumulaciones con función no conocida o con secuencias sin homología a las bases de datos de secuencia tuvieron $I \geq 15\%$ (Fig. 3). Además, entre estos, los grupos inmunizados con sub-acumulaciones que contienen clones
15 con una endopeptidasa putativa, nucleotidasa y dos de las sub-acumulaciones de cDNA con función no conocida o con secuencias sin homología a bases de datos de secuencia dieron por resultado niveles de infestación inferiores comparados a los ratones de control ($P \leq 0.05$) e $I \geq 40\%$ (Fig. 3). Clones
20 homólogos a proteínas coriónicas, receptores de vitelogenina, y proteínas de reconocimiento de peptidoglicano se seleccionaron para su capacidad de protección potencial en otras etapas del desarrollo de la garrapata.

Análisis estadístico

25 El número de larvas unidas por ratón y el número de



larvas engordadas recuperadas por ratón 7 días después de la infestación se compararon mediante el Análisis de Variación (ANOVA) seguido por una serie de pruebas post-hoc de Tukey para comparaciones de pares entre ratones inmunizados con cDNA y ratones inmunizados con ADN de vector de control (clasificación primaria), y mediante la prueba t del Estudiante entre ratones inmunizados con acumulaciones de cDNA positivas y la acumulación de cDNA F2 negativa de control (clasificación secundaria) o entre los ratones inmunizados con sub-acumulaciones de cDNA de prueba y ratones de control inmunizados con cDNAs mitocondriales (clasificación terciaria).

Ejemplo 2: Análisis de secuencia de clones protectores

Todos los 351 clones de cDNA en las 9 acumulaciones que resultaron positivos en la clasificación secundaria se secuenciaron. El ADN de clones individuales en estas acumulaciones se purificó (sistema de purificación de DNA de plásmido Wizard SV 96, Promega) de la placa patrón y parcialmente se secuenciaron. En la mayoría de los casos una secuencia más grande que 700 nucleótidos se obtuvo. Las secuencias de nucleótidos se analizaron utilizando el programa AlignX (Vector NTI Suite V 5.5, InforMax, North Bethesda, MD, EUA). BLAST (Altschul y colaboradores, 1990) se utilizó para buscar las bases de datos de NCBI para

identificar secuencias previamente clonadas que pueden tener homología a aquellas que los inventores secuenciaron. El análisis de secuencia permitió el agrupamiento de los clones de acuerdo con la identidad de secuencia a bases de datos de ADN y la función de la proteína predicha. Los clones protectores seleccionados de la clasificación terciaria se secuenciaron completamente.

La comparación a las bases de datos de secuencias permitió identificar la identidad de secuencia a los genes previamente reportados con función conocida en 152 (43%) de los clones (Tabla 2). Cincuenta siete por ciento de las secuencias fueron homólogas a genes con función desconocida o no tuvieron identidad significativa a las secuencias previamente reportadas (Tabla 2). De los clones con identidad de secuencia a genes con función conocida, 85% fueron homólogos a secuencias de artrópodos. Noventa y tres clones (61%) contuvieron 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 para el análisis adicional basado en su identidad de secuencia, incluyendo aquellos que contienen secuencias similares (Tabla 2). Los clones protectores incluyeron antígenos homólogos a endopeptidasas, nucleotidasas, proteínas coriónicas, receptores de vitelogenina, proteínas de reconocimiento de peptidoglicano, proteínas ricas en

glutamina-alanina, proteínas ribosomales y proteínas de choque térmico.

Resumen de los resultados

Los resultados obtenidos con los diversos clones protectores identificados en el Listado de Secuencias, junto con ciertas proteínas expresadas seleccionadas, se resumen en la Tabla 4.

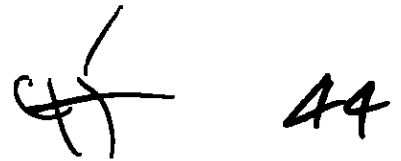
SEQ ID NO: 1 denota el clon designado 4E6, en donde el fragmento que codifica la proteína relevante se ha identificado que comprende los residuos 1-117, que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 3 denota el clon designado 4D8, en donde el fragmento que codifica la proteína relevante se ha identificado que comprende los residuos 80-575, que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 5 denota el clon designado 4F8, en donde el fragmento que codifica la proteína relevante se ha identificado que comprende los residuos 1-951, que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 7 denota el clon designado 4G11, en donde el fragmento que codifica la proteína relevante se ha identificado que comprende los residuos 1-697, que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 8.

SEQ ID NO: 9 denota el clon designado 4D6, en donde el fragmento que codifica la proteína relevante se ha



identificado que comprende los residuos 198-1025, que
codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 11 denota el clon designado 3E1, en
donde el fragmento que codifica la proteína relevante se ha
5 identificado que comprende los residuos 3-578, que codifica
el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 12.

SEQ ID NO: 13 denota el clon designado 1C10, en
donde el fragmento que codifica la proteína relevante se ha
identificado que comprende los residuos 1-1119, que codifica
10 el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 14.

SEQ ID NO: 15 denota el clon designado 3E10, en
donde el fragmento que codifica la proteína relevante se ha
identificado que comprende los residuos 51-1544, que codifica
el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 16.

15 SEQ ID NO: 17 denota el clon designado 4F11, en
donde el fragmento que codifica la proteína relevante se ha
identificado que comprende los residuos 31-2295, que codifica
el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 18.

SEQ ID NO: 19 denota el clon designado 3C12, en
20 donde el fragmento que codifica la proteína relevante se ha
identificado que comprende los residuos 6-332, que codifica
el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 20.

SEQ ID NO: 21 denota el clon designado 2C12, en
donde el fragmento que codifica la proteína relevante se ha
25 identificado que comprende los residuos 3-137, que codifica

45

el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 22.

SEQ ID NOS: 23, 24 y 25, denotan, respectivamente, los clones 1A9, 1B2 y 4A4, cada uno que comprende una secuencia parcial sin polipéptido asociado.

5 Ahora se ha descubierto que ciertos de los antígenos protectores exhiben actividad y se expresan a través de especies de garrapatas, y en algunas circunstancias a través de los géneros, haciendo posible de esta manera el uso de estos antígenos comunes en formulaciones de vacuna
10 anti-garrapata de amplia gama.

Ejemplo 3: Extensión de Antígenos protectores de I.

scapularis A Otras Especies de Garrapatas

Métodos

Extracción de RNA y transcripción inversa (RT)-PCR

15 El RNA total se extrajo de los intestinos y las glándulas salivales disectadas de 30 hembras de *I. scapularis* no alimentadas, aproximadamente 100 y 1000 ninfas y larvas de *I. scapularis*, respectivamente, la masa de huevo ovipositada por una hembra de *I. scapularis*, glándulas salivales
20 disectadas de 10 machos de *D. variabilis*, glándulas salivales e intestinos disectados de 20 adultos de *A. americanum* y *R. sanguineus*, 10 adultos de *B. microplus* y 10 hembras de *I. pacificus*, respectivamente y 100-150 larvas de *I. ricinus*. El RNA total se extrajo de muestras de garrapatas homogeneizadas
25 utilizan el TRI Reagen (Sigma), excepto para el RNA de *I.*

46

ricinus y *B. microplus* que se extrajeron utilizando el equipo Instapur de RNA (Eurogentec, Seraing, Bélgica) y miniequipo RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, EUA), respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pelletilla de RNA final se resuspendió en 50-100 µl de agua estéril desionizada destilada tratada con pirocarbonato de dietilo. Las reacciones TR-PCR se realizaron utilizando el sistema Access RT-PCR (Promega, Madison, WI, EUA). Uno µl de RNA se transcribió inversamente en una mezcla de reacción de 50 µl (MgSO₄ 1.5 mM, virus de mieloblastosis de ave 1 X (AMV) RT/solución reguladora de reacción de *Thermus flavus* (Tfl) hexámero aleatorio de 10 mM, 0.2 mM cada uno de trifosfato de deoxinucleosido (dNTP), 5 U AMV RT, 5u de polimerasa de DNA de Tfl (Promega), 10 pmol de cada cebador) a 48°C durante 45 min. Después de 2 min de incubación a 94°C, la PCR se realizó en la misma mezcla de reacción con cebadores específicos y condiciones de amplificación (Tabla 5). Las reacciones de control se realizaron utilizando los mismos procedimientos pero sin RT para controlar la contaminación de ADN en las preparaciones de RNA y sin RNA adicionado para controlar la contaminación de la reacción de PCR. Las reacciones de control positivas para la PCR se realizaron con el DNA de plásmido que contiene los cDNAs de garrapata clonadas y con ADN genómico extraído de células IDE8 de *I. scapularis*. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de

46

47

agarosa al 1% para verificar el tamaño de los fragmentos amplificados mediante la comparación a un marcador de peso molecular de DNA (1 Kb Plus ADN Ladder, Promega).

Clonación y secuenciación de 4D8 de *D. variabilis*, *A. americanum* y *B. microplus*

Fragmentos del cDNA de 4D8 de *D. variabilis*, *A. americanum* y *B. microplus* se amplificaron mediante RT-PCR y se clonaron en pGEM-T (Promega). Cuatro clones de cada uno se secuenciaron en la Core Sequencing Facility, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Noble Research Center, Oklahoma State University.

Vacunación de conejos y estimulación con ninfas de *I. Scapularis*, *D. variabilis* y *A. americanum*

Un experimento se diseñó para evaluar el efecto de los antígenos protectores de garrapatas en etapas ninfales de *I. scapularis*, *D. variabilis* y *A. americanum*. Un conejo Blanco de nueva Zelanda por grupo cada uno se inmunizó con 3 dosis (semanas 0, 4 y 7) que contienen 50 µg/dosis de proteínas 4F8 y 4D8 purificadas o el péptido sintético 4E6 derivado de *I. scapularis*, una combinación de 4F8+4D8+4E6 o albúmina bovina de suero (Sigma) como control en FIA (Sigma). Los animales fueron cuidados de acuerdo con los estándares especificados en la Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio. Los conejos se inyectaron subcutáneamente con 500 µL/dosis utilizando una jeringa de tuberculina de 1 ml y

una aguja 27½G. Dos semanas después de la última inmunización, los conejos se infestaron con 100 ninfas de *I. scapularis* por conejo en una oreja y 110 ninfas de cada *D. variabilis* y *A. americanum* en la otra oreja. El número de ninfas unidas se registró y las ninfas engordadas que caen de cada oreja del conejo fueron recolectadas diariamente y contadas durante 7 días. Las ninfas engordadas de *D. variabilis* y *A. americanum* se separaron abajo un microscopio de luz de disección. Las ninfas engordadas recolectadas después de la terminación del período de alimentación se contaron y se pesaron. La inhibición de la infestación ninfal de garrapatas se calculó con respecto al grupo de control como se describió previamente para infestaciones de garrapatas larvales (Almazán et al., 2003). La reducción en el peso de las ninfas engordadas se determinó en grupos experimentales con respecto a las ninfas recolectadas del grupo de control.

Resultados

Expresión de cDNAs protectores

La Expresión de genes que codifican para antígenos protectores de garrapata se analizó en mRNA y niveles de proteína por RT-PCR e inmunohistoquímica, respectivamente. La expresión del mRNA de 4F8, 4D8 y 4E6 se detectó en todas las etapas de desarrollo de *I. scapularis* y en los intestinos y las glándulas salivales de garrapatas

adultas (Tabla 6). Las reacciones de control excluyeron la contaminación con ADN genómico o durante la PCR. Además, la PCR del DNA genómico de garrapata mostró que el tamaño de los fragmentos de DNA amplificados fue más alto que el tamaño correspondiente a los fragmentos de cDNA, probablemente debido a la presencia de secuencias de intrón en los genes analizados (Tabla 6).

La conservación y expresión de secuencia de 4F8, 4D8 y 4E6 se analizaron en especies relacionadas con *I. scapularis*, *I. pacificus* e *I. ricinus*, y en *D. variabilis*, *R. sanguineus*, *B. microplus* y *A. americanum* mediante RT-PCR (Tabla 6) utilizando los cebadores 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

Las secuencias de cDNAs de 4D8 de *D. variabilis*, *A. americanum* y *B. microplus* y sus secuencias de aminoácidos deducidas se proporcionan en la SEQ ID NO: 26-31. Las secuencias asociadas con el antígeno de garrapata 4D8 derivado de *Rhipicephalus appendiculatus* se proporcionan en la SEQ ID NO: 38-39.

5/

50

Propiedades protectoras de los antígenos de garrapata contra las infestaciones ninfales de I. scapularis, D. variabilis y A. americanum

La detección de la expresión de 4D8 y 4E6 en
5 especies de garrapatas no de *Ixodes* fueron la base para un
experimento en el cual los conejos se inmunizaron con
antígenos protectores derivados de *I. scapularis* y se
estimularon con larvas de *I. scapularis*, *D. variabilis* y *A.*
americanum. Los resultados sugirieron un efecto de
10 inmunización 4D8 en la inhibición de las infestaciones
ninfales en todas las tres especies de garrapata y un efecto
notable en las ninfas de *D. variabilis* reflejado en el número
de garrapatas visiblemente dañadas y la reducción en el peso
de ninfas engordadas (Tabla 7). La inmunización con 4F8 tuvo
15 un afectó las infestaciones de ninfales de *I. scapularis*
solamente y el efecto de la inmunización 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
20 para 4D8 en las ninfas de *I. scapularis* (Tabla 7).

* * * * *

El experimento 3, entonces, demuestran la utilidad
sorprendente de utilizar los antígenos protectores de
garrapata de *I. scapularis* 4D8, 4F8 y 4E6 en formulaciones de
25 vacuna para el control de múltiples especies de garrapatas.

51

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos relacionadas con el antígeno protector denominado 4D8 se determinaron para las especies de garrapatas y cepas adicionales. Los cDNAs 4D8 y las secuencias de aminoácidos correspondientes se proporcionan en la SEQ ID NO: 40-62 para *I. ricinus*, *B. microplus* Cepich, *B. microplus* Muñoz, *B. microplus* S. Lucía, *R. sanguineus*, *D. marginatus*, *Hy. m. marginatum* 1, *Hy. m. marginatum* 2, *H. punctata* y *B. microplus* Susceptible junto con un listado de secuencias para la región de codificación 4D8 de *I. scapularis* (SEQ ID NO: 40) y las secuencias que representan el cDNA 4D8 completo y el aminoácido correspondiente para *D. variabilis* (SEQ ID NO: 47 y 58). La identidad/similitud de nucleótido y de aminoácido como es establecido mediante la comparación por pares de las secuencias de 4D8 de garrapatas se proporciona en la Tabla 8. Las secuencias se alinearon y el por ciento homología se determinó utilizando el programa AlignX (Vector NTI Suite V 5.5, InforMax, North Bethesda, MD, EUA. Como se mencionó en la misma, las diversas secuencias de 4D8 son principalmente conservadas, con las homologías que varían de 60-99%.

Así, la presente invención se relaciona a la identificación de estos antígenos que son protectores contra una amplia gama de especies de garrapatas, secuencias de genes y proteínas codificadas para tales antígenos, vacunas relacionadas y métodos útiles para inducir una respuesta

inmune. Más generalmente, la invención se relaciona a las secuencias de cDNA dadas y cualquier secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína que es capaz de inducir un anticuerpo u otra respuesta inmune (por ejemplo, la respuesta de célula T del sistema inmune) que reconoce un(os) epítotope(s) de las secuencias de aminoácidos representadas en el Listado de Secuencias, incluyendo menos de las secuencias de cDNA completas y mutantes de las mismas. Por consiguiente, la secuencia de nucleótidos puede codificar una proteína que es el antígeno completo codificado por las bases variadamente identificadas, o un fragmento o derivado del antígeno o un producto de fusión del antígeno o fragmento y otra proteína, con la condición de que la proteína que es producida de tal secuencia sea capaz de inducir un anticuerpo u otra respuesta inmune que reconoce un(os) epítotope(s) de las secuencias de aminoácidos dadas.

Como resultado, la invención comprende secuencias de ADN que codifican para y/o expresan en células transformadas apropiadas, proteínas que pueden ser el antígeno de longitud completa, fragmento de antígeno, derivado de antígeno o un producto de fusión de tal antígeno, fragmento de antígeno o derivado de antígeno con otra proteína.

Como será apreciado por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica, una secuencia de nucleótidos que

54

53

codifica los antígenos inventivos o variantes de los mismos pueden diferir de las secuencias nativas presentadas en la presente debido a las degeneraciones de codón, polimorfismos de nucleótido o sustituciones, supresiones o inserciones de nucleótidos. Mientras que varias modalidades de tales moléculas se representan en el listado de secuencias, se debe entender que dentro del contexto de la presente invención, la referencia a una o más de estas moléculas incluye variantes que son secuencias que ocurren naturalmente y/o sintéticas que son sustancialmente similares a las secuencias proporcionadas en la presente y, donde apropiado, la proteína (incluyendo péptidos y polipéptidos) que son codificados por estas secuencias y sus variantes. Como se utiliza en la presente, la secuencia de nucleótidos se considera que es "sustancialmente similar" y: (a) la secuencia de nucleótidos es derivada de región de codificación de un gen nativo de la diversas especies de garrapatas mencionadas y codifican un péptido o polipéptido que posee la antigenicidad descrita (incluyendo, por ejemplo, porciones de las secuencias o variaciones alélicas de las secuencias proporcionadas); o (b) las secuencias de nucleótidos se degeneran (es decir, secuencias que codifican el mismo aminoácido usando una secuencia de codón diferente) como un resultado del código genético a las secuencias de nucleótidos definidas en (a); o (c) la secuencia de nucleótidos es por lo menos 60% idéntica

54

a una secuencia de nucleótidos proporciona en la presente, o (d) es un complemento de cualquiera de las secuencias descritas en (a-c).

Las proteínas incluidas dentro de la presente
5 invención tienen una secuencia de aminoácidos representada en el Listado de Secuencia y homólogos de las mismas. Otras proteínas incluidas consisten de un fragmento de la secuencia capaz de inducir un anticuerpo u otra respuesta inmune que reconoce un(os) epítoto(s) de las secuencias de aminoácidos
10 representadas y un mutante de la secuencia capaz de inducir un anticuerpo u otra respuesta inmune que reconoce un(os) epítoto(s) de tales secuencias de aminoácidos. Una variante de preferencia debe tener por lo menos 60% de homología de secuencia de aminoácidos. Como se utiliza en la presente,
15 "homología" de aminoácidos se determina mediante un algoritmo de computadora incorporado en un programa de búsqueda de base de datos de proteína comúnmente utilizado en la técnica, por ejemplo, como incorporado en los programas AlignX (Vector NTI Suite V 5.5, InforMax, North Bethesda, MD, EUA), BLAST
20 (BLAST.TM., un programa de computadora) (Altschul y colaboradores, Nucleic Acids Res. (25) 3389-3402, 1997) o DNA STAR MEGALIGN (DNA STAR MEGALIGN.TM, un programa de computadora) que regresa resultados similares en cálculos de homología.

25 Las secuencias de nucleótidos pueden ser insertadas

en cualquiera de una amplia variedad de vectores de expresión mediante una variedad de procedimientos. Tales procedimientos y otros se consideran que son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los vectores adecuados incluyen secuencias cromosómicas, no cromosómicas y ADN sintético; por ejemplo, derivados de SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fago; plásmidos de levadura; vectores derivaron de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN viral tal como baculovirus, vaccínea, adenovirus, virus de fowl pox, pseudorrabias, etc.

La secuencia de DNA apropiada debe ser operativamente enlazada en el vector a una(s) secuencia(s) de control de expresión apropiada(s) (promotor) para dirigir la síntesis de mRNA. Como ejemplos representativos de tales promotores, se pueden mencionar el promotor LTR o SV40, el lac o trp de E. coli, el promotor PL lambda de fago y otros promotores conocidos para controlar la expresión de genes en células procarióticas y eucarióticas o sus virus. El vector de expresión incluye también una secuencia de no codificación para un sitio de enlace de ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión.

El vector que contiene la secuencia de cDNA apropiada como es descrito anteriormente en la presente, así como un promotor apropiado o secuencia de control, se puede

AP

56

emplear para transformar un hospedero apropiado para permitir al hospedero a expresar la proteína. Ejemplos de organismos de hospederos y células incluyen cepas bacterianas (por ejemplo, E. coli, Pseudomonas, Bacillus, Salmonella, etc.),
5 hongos (por ejemplo, levaduras y otros hongos), hospederos de animales o plantas (por ejemplo, células de tejido de ratón, puercos o animal y humanos). La selección del hospedero se considera que está dentro del alcance de aquellos expertos en la técnica.

10 También se entiende que la secuencia de cDNA apropiada en el vector cuando se introduce en un hospedero puede expresar parte o solamente una porción de la proteína que es codificada dentro de la terminología mencionada, siendo suficiente que la proteína expresada sea capaz de
15 inducir un anticuerpo u otra respuesta inmune que reconoce un(os) epítipo(s) de las secuencias de aminoácidos listadas.

Los cDNAs aislados y/o polipéptido expresado por el hospedero transformado por el vector se pueden recolectar por métodos que se les presentarán aquellos expertos en la
20 técnica y utilizados en una vacuna para la protección de un mamífero, tales como perros, ganado vacuno, humanos, etc., contra infestaciones de especies de garrapatas de *Ixodes* y no de *Ixodes*. Tales proteínas recombinantes protectoras y/o cDNAs modificado se utiliza en una cantidad efectiva para
25 inducir una respuesta inmune contra tales garrapatas y sus

patógenos asociados y se pueden utilizar en combinación con un portador fisiológicamente aceptable adecuado. El término "inducción de una respuesta inmune" cuando se utiliza con respecto a la vacuna descrita en la presente significa que la
5 vacuna previene la enfermedad asociada con una especie de garrapata particular o reduce la severidad de la enfermedad.

El portador empleado en conjunción con la vacuna puede ser cualquiera de una amplia variedad de portadores. Como ejemplos representativos de portadores adecuados, se
10 pueden mencionar aceite mineral, polímeros sintéticos, etc. Los portadores para vacunas son bien conocidos en la técnica y la selección de un portador adecuado se considera que está dentro del alcance de aquellos expertos en la técnica. La selección de un portador adecuado también es dependiente en
15 de la manera en la cual se va a administrar la vacuna.

La presente invención proporciona un método para inmunizar a un mamífero susceptible, contra infestaciones y enfermedades causadas por garrapatas con la vacuna descrita en lo anterior. Para propósitos de esta invención, la vacuna
20 se administra en una cantidad efectiva. La vacuna puede ser administrada mediante cualquiera de los métodos bien conocidos para aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, mediante inyección intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa. Alternativamente, la vacuna puede ser
25 administrada intranasalmente u oralmente. También se va a

58

58

entender que la vacuna puede incluir componentes activos, tales como componentes de patógenos transmitidos por garrapatas o adyuvantes además del(los) antígeno(s) o fragmentos descritos anteriormente en la presente.

5 El hospedero que expresa el antígeno puede ser utilizado por sí mismo para suministrar el antígeno a animales no humanos, al introducir células hospederas exterminadas o viables que son capaces de propagarse en el animal. La incorporación directa de las secuencias de cDNA en
10 células hospederas también puede ser utilizada para introducir las secuencias en células de animales para la expresión de antígeno *in vivo*.

Bibliografía

Las siguientes referencias se incorporan en la
15 presente por 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
20 library of *Trypanosoma cruzi*. Vaccine 1998; 16:608-12.
- Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, García-García 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-
25 1501 (2003).

St

59

- Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-García 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
5 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 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
15 sequences. *Proc Natl Acad Sci E U 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,
20 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
25 identification and characterization of protective

- antigens for development of recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Review of Vaccines*. 2:583-593.
- 5 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, Lleonart 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.
- 10 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, Lleonart R. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genet Anal* 15 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.
- 20 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.
- 25 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.

5 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.

10 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.

15 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.

25 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

5 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.

10 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:
15 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.

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,
25 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 Bakteriол 1999; 289:492-505.

5 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.

10 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
15 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.

20 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.
25 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.

5 Tabla 1. Clasificación primaria de la librería de cDNA de *I. scapularis* mediante ELI en ratones.

Grupo experi-mental ^a	Número de acumulaciones clasificadas (Números de clones)	Número promedio±SD de larvas unidas por ratón ^b	Número promedio±SD de larvas engordadas por ratón ^b	Inhibición promedio±SD de infestación de garrapatas (I) ^d	Número de acumulaciones seleccionadas para la clasificación secundaria
Experimento 1	33 (1383)	50±13 (33-80)	9±3 (2-42)	39±55% (-183 - 87%)	6 (I>75%)
Controles inmunizados con DNA de vector para el experimento 1	---	56±13 (45-67)	16±4 (5-27)	---	---
Experimento 2	33 (1322)	56±15 (29-79)	13±4 (1-27)	27±28% (-53 - 89%)	3 (I>60%)

Controles	---	54±18 (36-73)	17±3 (6-28)	---	---
inmunizados					
con el DNA					
de vector					
para el					
experimento					
2					

^aNoventa seis placas LBA que contienen un promedio de 41 clones de cDNA por placa se prepararon. Las replicas se hicieron y los clones de cada placa se acumularon, se inocularon, se cultivaron durante 2 horas en un placa de 96
5 cavidades y el DNA de plásmido se purificó de cada acumulación para ELI. Tres ratones por grupo cada uno se inmunizaron IM dos veces con 1 µg DNA/dosis 50 µl de PBS dos semanas por separado. Dos grupos de 3 ratones cada uno se incluyeron como controles. Un grupo se inyectó con el DNA de
10 vector y el segundo con solución salina solamente.

^bQuince días después de la última inmunización, los ratones se infestaron con 100 larvas de *I. scapularis* por ratón. Doce horas después, larvas que se unieron se contaron para calcular el número de larvas unidas por ratón y los ratones
15 se transfirieron a nuevas jaulas.

^cLas larvas engordadas que caen de cada ratón se recolectaron diariamente y se contaron después de 7 días.

^dLa inhibición de la infestación de garrapatas (I) para cada

66

grupo de prueba se calculó con respecto a los controles inmunizados con 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 por ratón para cada grupo de prueba, 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.

10 Tabla 2. Clasificación de los clones en acumulaciones protectoras mediante la función de proteína putativa de acuerdo con la identidad a bases de datos de secuencias.

	Función de proteína Putativa	Número de clones
	Biosintética ^a	2
15	Catabolismo	4
	Adhesión celular	2
	Ciclo de la célula ^a	2
	Citoesquelética ^a	8
	Defensa	2
20	Estructura de DNA o replicación ^a	3
	Matriz Extracelular	3
	Endocitosis	2
	Metabolismo de energía	10
	Homeostasis	2
25	Morfogenética	9

~~67~~ 67

	Mitocóndrica ^a	34
	Síntesis de proteína o procesamiento ^{a,b}	34
	Síntesis de RNA o procesamiento ^a	7
	Proteínas de choque térmico	4
5	Transducción de señal	16
	Transporte	8
	No conocida	199
	Total	351

^aEliminada de la clasificación adicional de antígenos
10 protectores. Otros clones se eliminaron por contener
secuencias similares.

^bExcepto para proteínas ribosomales.

Tabla 3. Agrupamiento de los clones de acuerdo con la función
predicha de las proteínas codificadas en sub-acumulaciones
15 para la clasificación terciaria.

Sub-acumulación (No. de clones)	Clon	Acumulación ^a
Ribosomal (17)	1A2, 1A10, 1C11	A5
	1F6	D1
	2B8	A10
	2F8, 2F10	E8
	3A10, 2C3, 3D2, 3D10	B4
	3G9, 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
Canal de célula/Transportador (5)	1F4	D1
	2H11	E8

68

	4A12 4G10, 4G11	C3 F1
Desarrollo temprano - específico (4)	1C8 3F4 4C7 4G9	A5 E3 C3 F1
Receptor acoplado a la proteína G (4)	2B7, 2C12 2F12 4C9	A10 E8 C3
Receptor de factor de crecimiento (3)	2E8 3B8, 3C8	B5 B4
Lectina (3)	3E10 4B8, 4C8	E3 C3
Vitelogenina (3)	1F12 4A6 4G2	D1 C3 F1
Choque térmico (3)	1C10 1F10 3F6	A5 D1 E3
EGF-similar (2)	2H4 4C10	E8 C3
Proteína secretada (2)	2F9 3C12	E8 B4
Rica en Glutamina-Alanina (2)	4D6, 4E6	F1
Adaptina (1)	3E1	E3
Endopeptidasa (1)	4D8	F1
Nucleotidasa (1)	4F8	F1

*Las acumulaciones de cDNA se refieren a acumulaciones positivas después de las clasificaciones primarias y secundarias (Fig. 2A y 2B).

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

Clon de cDNA	Proteína Predicha	Inhibición de infestación de garrapatas I (%)	Inhibi- ción de la 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	Rica en Glu-Ala	61*	11	66*
4E6	Rica en Glu-Ala	20*/46**	16**	55**
3E1	g-adaptina (región de la apéndice)	27*	5*	31*
2C12	Proteína precursora beta-amiloide (APP)	-8***	ND	ND
4F11	Bloqueo proliferación de Bop1	-39***	ND	ND
3E10	Lectina de enlace de mañosa	-48*/-10***	ND	ND
4G11	Canal de cloruro	38***	30	57
3C12	RNA polimerasa III	-104***	ND	ND
1A9, 1B2, 4A4	ATPasa	-57***	ND	ND

Los ratones se inmunizaron con DNA de plásmido de expresión que contiene cDNA como es descrito en lo anterior (*) o con 100 µg/dosis de proteína recombinante expresada en *E. coli* (**). I, M y E se calcularon como es descrito en lo anterior.

5 ND, no determinado.

***Dio por resultado una actividad de pro-alimentación. Este efecto podría ser debido a la expresión de cDNAs que codifican para inmunosupresores de garrapatas,

70 70

anticoagulantes y otras proteínas con baja antigenicidad y una actividad de pro-alimentación. Alternativamente, ellos podrían codificar proteínas homólogas a proteínas hospederas con actividad anti-garrapata, neutralización que da por resultado una actividad de pro-alimentación de la garrapata.

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

cDNA	Cebadores de RT-PCR (5'-3')	Condiciones de PCR ^a	Tamaño de la banda de cDNA ^b	Tamaño de la banda de DNA ^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: TGCTTGTTTGCAGATGCCCATCA (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: ATTGCACAACACATCATTAACTG (SEQ ID NO: 37)	94°C, 30 seg 52°C, 30 seg 68°C, 1 min	138 bp	~1,600 bp

^bCalculado de la secuencia del inserto de cDNA.

Tabla 6. Perfil de expresión de mRNAs que codifican para antígenos protectores en garrapatas.

[illegible]

La expresión de mRNAs que codifican para antígenos protectores de garrapata 4F8, 4D8 y 4E6 se analizó mediante

RT-PCR en diferentes especies utilizando los cebadores de secuencias de *I. scapularis*.

Tabla 7. Resultados de la vacunación con los antígenos protectores de garrapata recombinantes en ninfas de *I. scapularis*, *D. variabilis* y *A. americanum*.

Especies de garrapatas	Inhibición de la infestación ninfal de garrapatas (%) ^a				Reducción en el peso de ninfas engordadas (%) ^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

^aDeterminado con respecto al número de ninfas engordadas recuperadas del grupo de control como es descrito en lo anterior para infestaciones larvales de garrapatas.

10 ^bPeso promedio por ninfa engordada con respecto al peso de ninfas recolectadas del grupo de control.

Tabla 8. Identidad/similitud de nucleótidos (arriba de la diagonal) y aminoácidos (abajo de la diagonal) para todas las comparaciones por pares de las secuencias de 408 de garzapata

	<i>I. s</i>	<i>A. a</i>	<i>R. a</i>	<i>Hy. m</i> 1	<i>Hy. m</i> 2	<i>R. s</i>	<i>I. r</i>	<i>R. m</i> S. Luisa	<i>R. m</i> Cepich	<i>R. m</i> Muñoz	<i>R. m</i> Susceptible	<i>D. v</i>	<i>D. m</i>	<i>H. p</i>
<i>I. scapularis</i>	100	72	71	66	67	72	98	65	65	65	65	75	74	77
<i>A. americanum</i>	66	100	71	80	80	72	72	80	80	80	80	74	74	73
<i>R. appendiculatus</i>	68	72	100	80	80	95	71	86	86	86	86	87	88	76
<i>Hy. m. marginatum</i> 1	64	81	74	100	100	82	66	90	90	90	90	81	81	68
<i>Hy. m. marginatum</i> 2	65	81	74	99	100	82	67	90	90	90	90	81	81	68
<i>R. sanguineus</i>	68	70	92	80	80	100	72	86	86	86	86	89	90	77
<i>I. ricinus</i>	84	71	72	69	69	71	100	65	65	65	65	75	74	78
<i>B. microplus</i> S. Luisa	60	78	85	86	86	90	64	100	100	100	99	80	80	68
<i>B. microplus</i> Cepich	60	78	85	86	86	90	64	100	100	99	99	80	80	68
<i>B. microplus</i> Muñoz	60	78	85	86	86	90	64	100	100	100	99	80	80	68
<i>B. microplus</i> Susceptible	60	78	85	86	86	90	64	99	99	99	100	79	80	68
<i>D. variabilis</i>	74	81	80	83	83	86	79	78	78	78	78	100	97	77
<i>D. marginatus</i>	74	81	81	83	83	88	79	79	79	79	79	98	100	78
<i>H. punctata</i>	72	73	74	71	71	75	78	68	68	68	68	80	81	100

Las secuencias se alinearon y el por ciento de identidad/similitud se determinó usando el programa AlignX (Vector NTI Suite V 5.5, Informa, North Bethesda, MD, USA). Los valores para las comparaciones de secuencia de la cepa *B. microplus* están contenidos dentro del área cuadrada

8

2

24

74

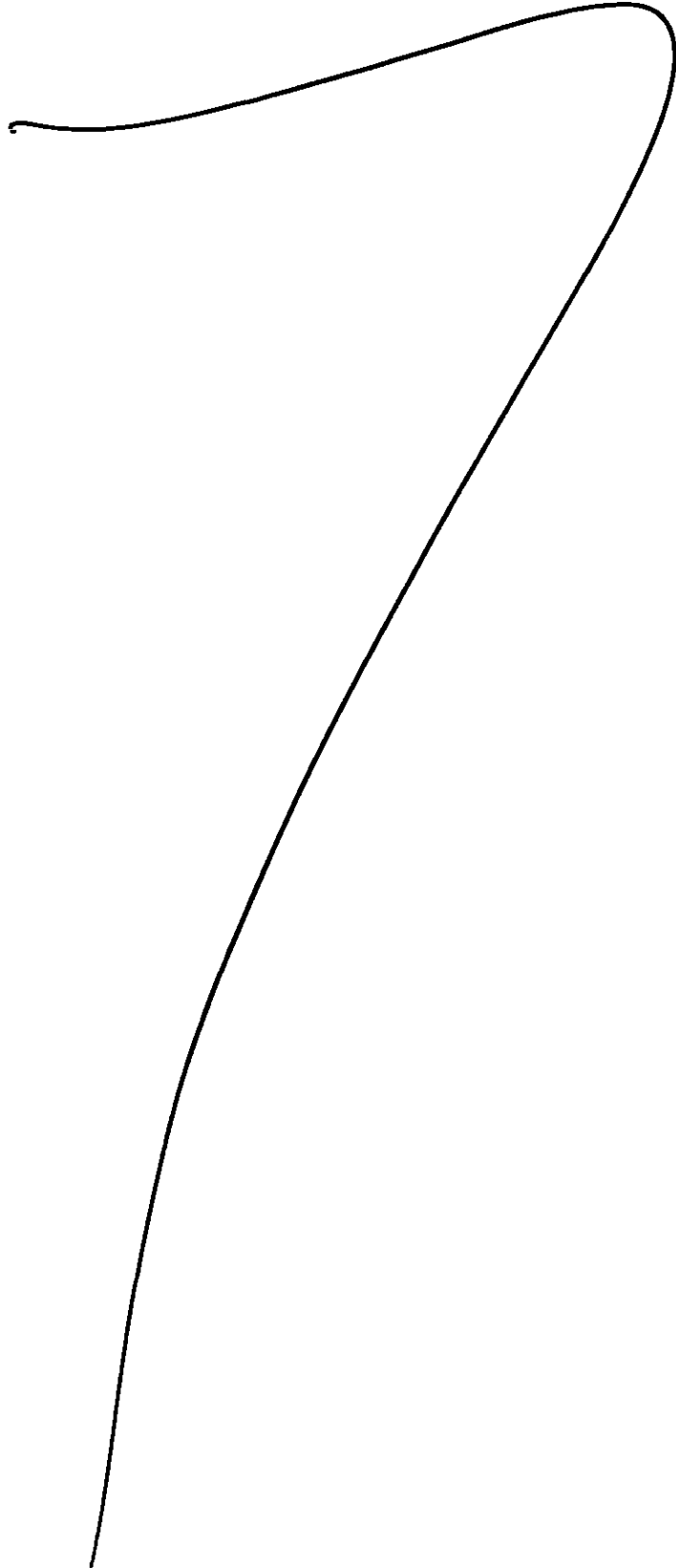
En vista de lo anterior, será observado que se logran los diversos objetivos de la invención y se alcanzan otros resultados ventajosos. Como varios cambios se podrían hacer en las moléculas de ADN anteriores, proteínas, etc. sin apartarse del alcance de la invención, se propone que toda la materia contenida en la descripción anterior o mostrada en los dibujos acompañantes será interpretada como ilustrativa y no en un sentido limitativo. Mientras que la invención se ha descrito con un cierto grado de particularidad, se entiende que la invención no está limitada a la(s) modalidad(es) expuesta(s) en la presente para propósitos de ejemplificación, sino que es limitada solamente por el alcance de la reivindicación o reivindicaciones adjuntas, incluyendo el intervalo completo de equivalencia al cual es intitulado cada elemento del mismo.

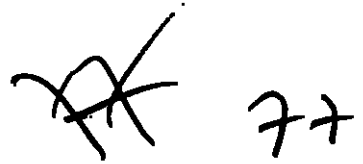
/ 75

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado, caracterizado porque comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOS: 52 hasta 62, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, 5 SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 39, o un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 60% homóloga a por lo menos una de las SEQ ID NOS: 52 hasta 62, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 39.
- 10 2. Una composición de vacuna anti-garrapata multiespecies, caracterizada porque comprende un polipéptido de la reivindicación 1 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 15 3. Una composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque la composición comprende más de uno de los polipéptidos de acuerdo a la reivindicación 1.
- 20 4. Una composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque la composición comprende tres o más polipéptidos de acuerdo a la reivindicación 1.
- 25 5. Uso de un polipéptido aislado de conformidad con la reivindicación 1 o la composición de vacuna de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2-4 en la manufactura de un medicamento para inducir una respuesta inmune en un

mamífero contra la infestación de garrapatas multiespecies y sus patógenos asociados.



**RESUMEN DE LA INVENCION**

Antígenos protectores de amplia gama contra
infestaciones de garrapatas, secuencias de genes y proteínas
codificadas para tales antígenos, vacunas relacionadas y
5 métodos útiles para inducir una respuesta inmune.

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*

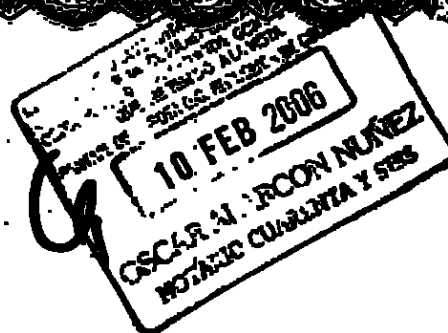
8. No. *C00023964*

9. Seal/stamp of the State of Oklahoma

10. Signature:

Pat Coats

Pat Coats
Administrative Technician



Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

79

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 enseñanzas, 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 desistir 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 creyeran 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. 16-56 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 obtainers of vegetables 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 deed, 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. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

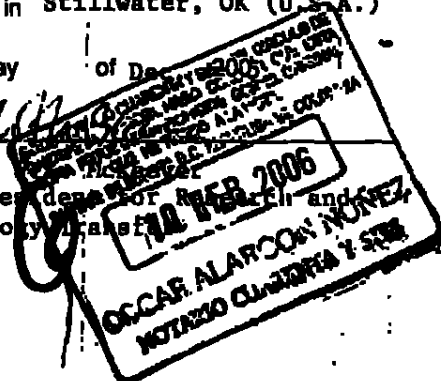
Granted and signed in Stillwater, OK (U.S.A.)

this 6th day of Dec

Signature

Name
Title

Stephen
Vice President for Research
Technology



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

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**

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**

Hoy de de compareció(aron) 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)

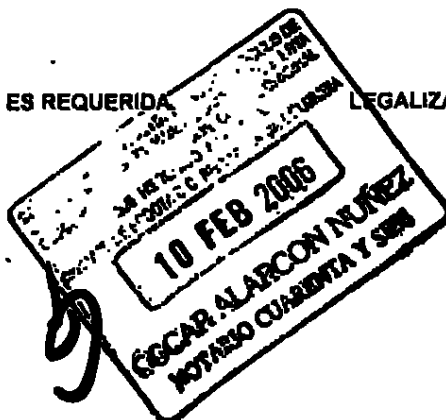
On this day of personally appeared before me

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)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.



80

**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 publico
- 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

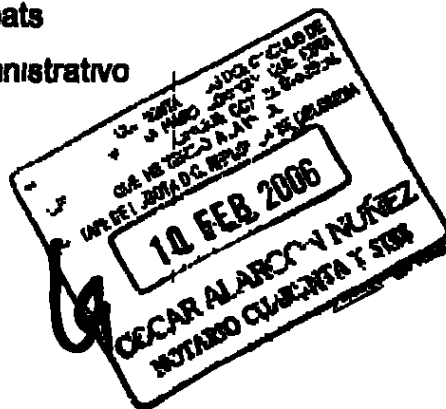
- 5 en Oklahoma City Oklahoma Estados Unidos de América
- 6 El 20 de diciembre de 2005
- 7 por el Técnico Administrativo
- 8 No C00023964
- 9 Sello/timbre del Estado de Oklahoma

10 Firma

(Firma)

Pat Coats

Técnico Administrativo





81

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad 06-077106-40000-0000

Fes 2006-08-04 17:20:02 Dep 2020 NUECREACIONES

Tra 2 PATENTES

Eva 1 REGDEPOSITO

Act1411 PRESENTACION

Folios 20

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMIS
PCT

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la invención []
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se 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 trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Fdo B
Firma Responsable

Fecha 4-10-06

Carrera 13 No 27 00 Piso 5 7 y 10
Conmutador 3 82 08 40
Fax 350 52 20
E mail info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D C Colombia

B.V.

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA BARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY

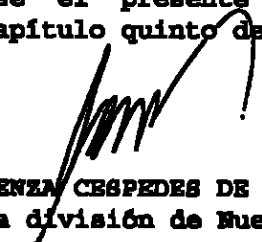
REFERENCIA	Radicación No. 6 77106
	Trámite 2
	Evento 1
	Actuación 430
	Oficio No. 11884

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 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).

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 CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 19 OCT. 2006
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 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.