

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
Rad: 06-077106-00002-0000  
Fec: 2006-12-06 17:01:35 Dep. 2020 NUECREACIONES  
Tra. 2 PATENTES  
Eva: 1 REGDEPOSITO  
Id 444 RESPUESTAREQUE Folio: 211

AS: 101.825

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

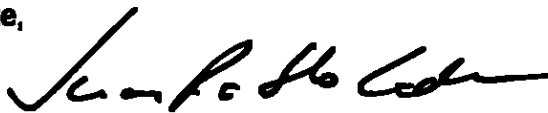
RESPUESTA A OFICIO 11884 DE OCTUBRE 19, 2006

REF: Expediente No. 06 077.106 - Solicitud de Patente  
de THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY  
Titulada: ANTÍGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE  
INFESTACIONES POR MULTIESPECIES DE GARRAPATAS

**JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**, vecino de Bogotá, portador de la tarjeta profesional No. 57492, obrando como apoderado de la sociedad THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY, según lo acredita el documento de Poder presentado en esa División, para dar cumplimiento al requerimiento notificado por fijación en lista el 19 de Octubre de 2006 y de acuerdo con los Artículos 38 y 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, Artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la SIC, me permito allegar:

1. Documento donde consta la cesión del derecho a la Patente otorgado por los inventores al solicitante, debidamente apostillado, junto con su correspondiente traducción al castellano.
2. Copia certificada por la Oficina de Patentes de Estados Unidos, de la primera solicitud presentada para la misma invención, de la cual REIVINDICAMOS PRIORIDAD, junto con su correspondiente traducción al castellano.
3. Extracto para publicación y Tarjeta de Archivo Temático.

De la señora jefe atentamente,



**JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**  
C.C. No. 80.410.337 de Usaquén  
Cra 7 No. 71-21 TORRE B - Piso 4

Bogotá, Diciembre 06, 2006  
CHP/MEV/har

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                    |                                                                                                                            |           |                                          |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------------------------------|--|
|  <b>INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>SUPERINTENDENCIA</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                    | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br><b>TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO</b> |           | <b>84</b>                                |  |
| <b>PATENTE DE INVENCION</b> <u>X</u> <b>PCT</b> <u>    </u> <b>MODELO DE UTILIDAD</b> <u>    </u> <b>DISEÑO INDUSTRIAL</b> <u>    </u>                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                    |                                                                                                                            |           |                                          |  |
| (21) N° de solicitud: 06 077 106                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                    | (22) Fecha de solicitud: 04-08-2006                                                                                        |           | <b>FIGURA CARACTERISTICA</b><br>6 x 6 cm |  |
| (51) Clasificación Internacional :                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                    |                                                                                                                            |           |                                          |  |
| (71) Solicitante(s) THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                    |                                                                                                                            |           |                                          |  |
| (72) Inventor(es) José de Jesús de La Fuente, Katherine M. Kocan,<br>Consuelo García-Almazán, Edmour F. Blouin                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                    |                                                                                                                            |           |                                          |  |
| (74) Agente: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                    |                                                                                                                            |           |                                          |  |
| (30) Prioridad                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | (31) No. Prioridad | 32) Fecha                                                                                                                  | (33) País |                                          |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 11/197,133         | 04-08-2005                                                                                                                 | US        |                                          |  |
| (85) Fecha inicio fase nacional:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                    | (87) Publicación internacional:                                                                                            |           |                                          |  |
| (86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                    | Fecha:                                                                                                                     |           |                                          |  |
| Fecha de presentación de la solicitud:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                    | No. Publicación: WO                                                                                                        |           |                                          |  |
| No. de solicitud PCT/                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                    |                                                                                                                            |           |                                          |  |
| (54) Título: ANTÍGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES POR MULTIESPECIES DE GARRAPATAS                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                    |                                                                                                                            |           |                                          |  |
| (57) Relvindicación(es): 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, 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, |                    |                                                                                                                            |           |                                          |  |
| CONTINUA AL RESPALDO ...                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                    |                                                                                                                            |           |                                          |  |

SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 39.

2. Una composición de vacuna anti-garrapata multiespecies, caracterizada porque comprende un polipéptido de la reivindicación 1 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

|                                                                                                                                              |                    |                                                                                                                                                                         |            |           |                                                                                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| <div><b>Industria y Comercio</b><br/>SUPERINTENDENCIA</div> |                    | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br><b>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN</b><br><b>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION</b> |            |           |                                                                                           |
| (21) N° de solicitud: 08 077 108                                                                                                             |                    | (51) Int Cl:                                                                                                                                                            |            |           |                                                                                           |
| 22) Fecha de solicitud: 04-08-2008                                                                                                           |                    | (71) Solicitante(s) THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY                                                                                                  |            |           |                                                                                           |
| (30) Prioridad                                                                                                                               | (31) No. Prioridad | 32)                                                                                                                                                                     | Fecha      | (33) País | (72) Inventor(es)                                                                         |
|                                                                                                                                              | 11/197,133         |                                                                                                                                                                         | 04-08-2005 | US        | José de Jesús de La Fuente, Katherine M. Kocan, Consuelo Garcia-Almazán, Edmour F. Blouin |
|                                                                                                                                              |                    |                                                                                                                                                                         |            |           | (74) Agente: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO                                                  |
| (54) Título: ANTÍGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES POR MULTIESPECIES DE GARRAPATAS                                |                    |                                                                                                                                                                         |            |           |                                                                                           |

Reivindicación(es):

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, 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.
2. Una composición de vacuna anti-garrapata multiespecies, caracterizada porque comprende un polipéptido de la reivindicación 1 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

OFFICE OF THE SECRETARY OF STATE



86

**APOSTILLE**  
 (Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: *United States of America*

*This public document*

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

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

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

**CERTIFIED**

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

6. The *12th day of September, 2006*

7. By *Administrative Technician*

8. No. *C00032367*



10. Signature:

*Pat Coats*

*Pat Coats*  
*Administrative Technician*

87

#372499 v1



88

**UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

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

NOVEMBER 04, 2005

PTAS

**\*500058704A\***

**\*500058704A\***

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

**UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT**

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

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

RECORDATION DATE: 11/04/2005

REEL/FRAME: 016731/0020  
NUMBER OF PAGES: 4

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).  
DOCKET NUMBER: 03300-57338 (05-261)

**ASSIGNOR:**

DE LA FUENTE, JOSE DE JESUS

DOC DATE: 10/10/2005

**ASSIGNOR:**

KOCAN, KATHERINE M.

DOC DATE: 09/09/2005

**ASSIGNOR:**

GARCIA-ALMAZAN, CONSUELO

DOC DATE: 09/16/2005

**ASSIGNOR:**

BLOUIN, EDMOUR F.

DOC DATE: 09/09/2005

016731/0020 PAGE 2

**ASSIGNEE:**

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

**SERIAL NUMBER:** 11197133

**FILING DATE:** 08/04/2005

**PATENT NUMBER:**

**ISSUE DATE:**

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

**ASSIGNMENT DIVISION  
OFFICE OF PUBLIC RECORDS**

## PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1  
Stylesheet Version v1.1

90

| SUBMISSION TYPE:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | NEW ASSIGNMENT                                     |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------|----------------------------|------------------------|--------------------|------------|-------------------------|------------|------------------|------------|
| NATURE OF CONVEYANCE:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | ASSIGNMENT                                         |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| CONVEYING PARTY DATA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                    |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| <table border="1"><thead><tr><th>Name</th><th>Execution Date</th></tr></thead><tbody><tr><td>Jose de Jesus de la Fuente</td><td>10/10/2005</td></tr><tr><td>Katherine M. Kocan</td><td>08/09/2005</td></tr><tr><td>Consuelo Garcia-Almazan</td><td>08/16/2005</td></tr><tr><td>Edmour F. Blouin</td><td>08/09/2005</td></tr></tbody></table> |                                                    | Name          | Execution Date                                     | Jose de Jesus de la Fuente | 10/10/2005             | Katherine M. Kocan | 08/09/2005 | Consuelo Garcia-Almazan | 08/16/2005 | Edmour F. Blouin | 08/09/2005 |
| Name                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Execution Date                                     |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| Jose de Jesus de la Fuente                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 10/10/2005                                         |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| Katherine M. Kocan                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 08/09/2005                                         |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| Consuelo Garcia-Almazan                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 08/16/2005                                         |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| Edmour F. Blouin                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 08/09/2005                                         |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| RECEIVING PARTY DATA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                    |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| <table border="1"><tr><td>Name:</td><td>The Board of Regents for Oklahoma State University</td></tr><tr><td>Street Address:</td><td>Student Union Building</td></tr><tr><td>City:</td><td>Stillwater</td></tr><tr><td>State/Country:</td><td>OKLAHOMA</td></tr><tr><td>Postal Code:</td><td>74078</td></tr></table>                          |                                                    | Name:         | The Board of Regents for Oklahoma State University | Street Address:            | Student Union Building | City:              | Stillwater | State/Country:          | OKLAHOMA   | Postal Code:     | 74078      |
| Name:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | The Board of Regents for Oklahoma State University |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| Street Address:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Student Union Building                             |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| City:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Stillwater                                         |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| State/Country:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | OKLAHOMA                                           |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| Postal Code:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 74078                                              |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| PROPERTY NUMBERS Total: 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                    |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| <table border="1"><thead><tr><th>Property Type</th><th>Number</th></tr></thead><tbody><tr><td>Application Number:</td><td>11197133</td></tr></tbody></table>                                                                                                                                                                                 |                                                    | Property Type | Number                                             | Application Number:        | 11197133               |                    |            |                         |            |                  |            |
| Property Type                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Number                                             |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| Application Number:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 11197133                                           |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| CORRESPONDENCE DATA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                    |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| Fax Number: (918)583-9658<br><i>Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.</i>                                                                                                                                                                                                                            |                                                    |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| Phone: (918) 598-0821                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                    |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| Email: patents@fellersenider.com                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                    |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| Correspondent Name: R. Alan Weeks                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                    |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| Address Line 1: 321 S. Boston Ave., Suite 800                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                    |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| Address Line 4: Tulsa, OKLAHOMA 74103-3318                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                    |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| ATTORNEY DOCKET NUMBER:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | O3300-57338 (05-261)                               |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| NAME OF SUBMITTER:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | R. Alan Weeks                                      |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |
| Total Attachments: 2<br>source=11197133#page1.tif                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                    |               |                                                    |                            |                        |                    |            |                         |            |                  |            |

OP 540.00 11197133

500058704

PATENT  
REEL: 016731 FRAME: 0020

4

PATENT  
REEL: 016731 FRAME: 0021

**ASSIGNMENT**

WHEREAS, JOSE DE JESUS DE LA FUENTE, residing at 400 Squires Landing, Apt. M-5, Stillwater, OK 74074; KATHERINE M. KOCAN, residing at 3909 E. 92nd Street, Perkins, OK 74059; CONSUELO GARCIA-ALMAZAN, residing at Prol. Aldama 1424, Trac. La Sierra, Ca. Ucetoria, Tam. CP 87037, MEXICO; and EDMOUR F. BLOUIN, residing at 3909 E. 92nd Street, Perkins, OK 74059, (hereinafter referred to as "ASSIGNORS") are co-inventors of a certain new and useful invention entitled "PROTECTIVE ANTIGENS AND VACCINES FOR THE CONTROL OF MULTI SPECIES TICK INFESTATIONS" for which a utility application for Letters Patent of the United States was filed on August 4, 2005, as Serial No. 11/197,133, which is a continuation-in-part of corresponding application Serial No. 10/972,789, filed October 25, 2004, which in part is a continuation-in-part of corresponding application Serial No. 10/425,563, filed April 29, 2003, which application claims the benefit of prior filed provisional application Serial No. 60/376,251; and

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

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

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

93

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

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

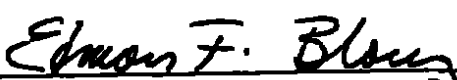
AND, ASSIGNORS further agree to communicate to ASSIGNEE, its successors, assigns, or other legal representatives, such facts relating to the invention disclosed in the present application or Letters Patent issuing therefrom as may be known, and to testify as to such facts in any interference or other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

Executed by the undersigned on the date indicated.

  
JOSE DE JESUS DE LA FUENTE      10/10/05  
Date

  
KATHERINE M. KOCAN      9-9-05  
Date

  
CONSUELO GARCIA-ALMAZAN      9/16/05  
Date

  
EDMOUR F. BLOUIN      9/19/05  
Date

325020.1

RECORDED: 11/04/2005

PATENT  
REEL: 016731 FRAME: 0023

La presente es una traducción Oficial del idioma Inglés al Español de un documento de traspaso con Apostilla realizada en Bogotá el día 14 de Noviembre de 2006

74

# ESTADO DE OKLAHOMA



## APOSTILLA

(Convención De La Haya De 5 Octubre 1961)

1. País: Estados Unidos De América

Este documento público

2. Ha sido firmado por:

Jamie A. Robinson

3. Que actúa en la calidad de:

Notario Público Estado de Oklahoma

4. Lleva el sello /estampilla de:

Jamie A. Robinson Notario Público

### Certifica

5. En la Ciudad de Oklahoma, Oklahoma E.U.A.

6. El 12 De Septiembre 2006

7. Por: Técnico Administrativo

8. No. C00032367

9. Sello/Estampilla del Estado de Oklahoma:

10. Firma

Aparece firma ilegible

(aparece sello: Gran Sello del

Pat Coat

Estado de Oklahoma

Técnico Administrativo

BEATRIZ EUGENIA ALARCON GUTIERREZ  
TRADUCTORA E INTERPRETE  
RESOLUCION 2512 DE SEPT. 15/93 MINJUSTICIA

13 95

EL ESTADO DE OKLAHOMA )

)SS.

CONDADO DE TULSA )

Certifico que el documento adjunto es una copia fiel y exacta, del TRASPASO de JOSE DE JESUS DE LA FUENTE, KATHERINE M. KOCAN, CONSUELO GARCIA-ALMAZAN, y EDMOUR F. BLOUIN, (como Cedentes) al THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY (como Cesionario) en donde los Cedentes traspasan todos sus derechos, título e interés en y a la invención titulada "ANTÍGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE GARRAPATA DE MÚLTIPLES ESPECIES" al Cesionario, registrada con la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos en Noviembre 4, 2005, en el Rollo 016731, Cuadro 0020, cuyo documento original he visto.

Aparece sello (JAMIE A.  
ROBINSON  
NOTARIO  
#01016710  
Exp. 11/08/09  
ESTADO DE OKLAHOMA)

FECHADO SEPTIEMBRE 7, 2006

(aparece firma)

Jamie A. Robinson, Notario Público

BEATRIZ EUGENIA ALARCON GUTIERREZ  
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL  
RESOLUCION 2512 DE SEPT. 15/93 MINJUSTICIA

HF 96



**OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS  
ESTADOS UNIDOS**

DE ACUERDO CON LA SECRETARÍA DE COMERCIO PARA LA PROPIEDAD  
INTELECTUAL Y DIRECTOR DE LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE  
LOS ESTADOS UNIDOS

Noviembre 04, 2005

\*500058704A  
\*500058704A

PTAS

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

**OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS  
NOTIFICACIÓN DE REGISTRO DE DOCUMENTO DE TRASPASO**

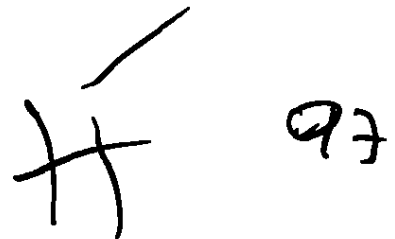
EL DOCUMENTO ADJUNTO HA SIDO REGISTRADO POR LA DIVISIÓN DE TRASPASOS DE LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS. UNA COPIA DE MICROPELÍCULA COMPLETA ESTÁ DISPONIBLE EN EL CUARTO DE BÚSQUEDA DE TRASPASOS EN EL NÚMERO DE CARRETE Y CUADRO REFERENCIADO ADELANTE.

POR FAVOR REVISE TODA LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE AVISO. LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE AVISO DE REGISTRO REFLEJA LOS DATOS PRESENTES EN EL SISTEMA DE TRASPASO DE MARCAS Y PATENTES. SI USTED ENCONTRARA ALGÚN ERROR O TIENE PREGUNTAS RELACIONADAS CON ESTE AVISO, PUEDE CONTACTAR AL EMPLEADO CUYO NOMBRE APARECE EN ESTE AVISO EN 571-272-3350. POR FAVOR ENVÍE SOLICITUD PARA CORRECCIÓN A: OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS, PARADA DE CORREO: DIVISIÓN DE SERVICIOS DE TRASPASOS, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA VA 22313.

FECHA DE REGISTRO: 11/04/2005 ROLLO/CUADRO: 016731/0020

NÚMERO DE PÁGINAS: 4

*B. A. S.*  
BEATRIZ EUGENIA ALARCON  
TRADUCTORA E INTERPRETE  
RESOLUCION 2512 DE SEPT. 15/04 MINISTERIO



RESUMEN: TRASPASO DE INTERÉS DEL CEDENTE (VER DOCUMENTO PARA DETALLES).

NÚMERO DE REGISTRO: 03300-57338 (05-261)

CEDENTE:

DE LA FUENTE JOSE DE JESUS.

FECHA

DEL

DOCUMENTO: 10/10/2005

CEDENTE:

KOCAN, KATHERINE M.

FECHA

DEL

DOCUMENTO: 09/09/2005

CEDENTE:

GARCIA-ALMAZAN, CONSUELO

FECHA

DEL

DOCUMENTO: 09/16/2005

CEDENTE:

BLOUIN, EDMOUR.

FECHA

DEL

DOCUMENTO: 09/09/2005

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 – [www.USPTO.GOV](http://www.USPTO.GOV)

016731/0020 PÁGINA 2

CESIONARIO:

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

NÚMERO DE SERIE: 11197133 FECHA DE PRESENTACIÓN: 08/04/2005

NÚMERO DE PATENTE:

FECHA DE PUBLICACIÓN:

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

DIVISIÓN DE TRASPASOS  
OFICINA DE REGISTROS PÚBLICOS

  
BEATRIZ EUGENIA ALARCON GUTIERREZ  
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL  
RESOLUCION 2512 DE SEPT. 15/93 MINJUSTIA

78

| TRASPASO DE PATENTE                                                                                |                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Versión Electrónica v1.1                                                                           |                                                                          |
| Versión Proforma v1.1                                                                              |                                                                          |
| TIPO DE PRESENTACIÓN                                                                               | NUEVO TRASPASO                                                           |
| NATURALEZA DE LA CESIÓN                                                                            | traspaso                                                                 |
| DATOS DE LAS PARTES CEDENTES                                                                       |                                                                          |
| Nombre                                                                                             |                                                                          |
| José de Jesús de la Fuente                                                                         | 10/102005                                                                |
| Katherine M. Kocan                                                                                 | 09/09/2005                                                               |
| Consuelo Garcia-Almazán                                                                            | 09/16/2005                                                               |
| Edmour F. Blouin                                                                                   | 09/09/2005                                                               |
| DATOS DE LAS PARTES QUE RECIBEN                                                                    |                                                                          |
| Nombre:                                                                                            | The Board of Regents for Oklahoma State University                       |
| Dirección:                                                                                         | Student Union Building                                                   |
| Ciudad:                                                                                            | Stillwater                                                               |
| Estado/País                                                                                        | OKLAHOMA                                                                 |
| Código Postal                                                                                      | 74078                                                                    |
| TOTAL NÚMEROS DE PROPIEDAD                                                                         |                                                                          |
| Tipo de Propiedad                                                                                  | Número                                                                   |
| Número de Solicitud                                                                                | 11197133                                                                 |
| FECHA DE CORRESPONDENCIA                                                                           |                                                                          |
| Número de fax:                                                                                     | (918)583-9659                                                            |
| <i>La correspondencia será enviada por vía de correo US cuando no sea exitoso el envío por fax</i> |                                                                          |
| Teléfono:                                                                                          | (918) 599-0621                                                           |
| Email:                                                                                             | <a href="mailto:patents@fellrussnider.com">patents@fellrussnider.com</a> |
| Nombre de correspondencia:                                                                         | R. Alan Weeks                                                            |
| Línea de Dirección 1:                                                                              | 321 S. Boston Ave., Suite 800                                            |
| Línea de Dirección 4:                                                                              | Tulsa OKLAHOMA 74103-3318                                                |
| Número de Registro de Abogado                                                                      | 03300-57338 (05-261)                                                     |
| Nombre de Remitente                                                                                | R. Alan Weeks                                                            |
| Total Anexos: 2<br>source=1197133#page1.tif<br>50058704                                            | PATENTE<br>ROLLO: 016731 CUADRO:0020                                     |

  
 BEATRIZ EUGENIA ALARCON GUTIERREZ  
 TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL  
 APROBACION 2512 DE SEPT. 15/03 MINISTERO

H 99

Source=11197133#page2.tif

PATENTE  
ROLLO: 016731 CUADRO:0020

B. B. B. B.  
BEATRIZ EUGENIA ALARCON GUTIERREZ  
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL  
RESOLUCION 2512 DE SEPT. 15/93 MINJUSTICIA

100

PATENTE

Registro de Abogado No. 57338/05-261

Traspaso

Página 1

**TRASPASO**

CONSIDERANDO, que JOSÉ DE JESÚS DE LA FUENTE residente en 400 Squires Landing, apt. M-5, Stillwater, OK 74074; KATHERINE M. KOCAN, residente en 3909 E. 92nd Street, Perkins, OK 74059; CONSUELO GARCÍA-ALMAZAN, residente en Prol. Aldama 1424, Trac. La Sierra, Ca. Ucetoria, Tam. CP 87037, MÉXICO; y EDMOUR F. BLOUIN, residente en 3909 E. 92nd Street, Perkins, OK 74059, (de aquí en adelante los "CEDENTES"), son co-inventores de una cierta nueva y útil invención titulada "ANTÍGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE INFESTACIONES DE GARRAPATA DE MÚLTIPLES ESPECIES" para el cual se presenta solicitud de Título de Patente de los Estados Unidos en Agosto 4, 2005, como Número de Serie 11/197,133, que es una continuación en parte de la solicitud correspondiente Serie No. 10/972,789, presentada en Octubre 25, 2004, que en parte es una continuación en parte del número de serie de solicitud correspondiente número de Serie 10/425,563, presentada en Abril 29, 2003, cuya solicitud reivindica el beneficio de solicitud provisional presentado anteriormente número de serie 60/376,251; y

CONSIDERANDO, THE BOARD OF REGENTS FOR OKLAHOMA STATE UNIVERSITY, una institución de educación superior ubicada en Stillwater, Oklahoma, (de aquí en adelante el "Cesionario") está deseosa de adquirir el derecho completo, título e interés de los CEDENTES en y para la invención y solicitud mencionadas anteriormente, y en, para y bajo cualquiera y todos los títulos de patente de los Estados Unidos y en cualquiera y todos los países extranjeros; y de hecho ha adquirido tales derechos por virtud del traspaso anterior por los CEDENTES al CESIONARIO de la materia objeto de la solicitud provisional identificada anteriormente;;

AHORA, POR LO TANTO, tomando nota de este documento que para buena y valiosa consideración, el recibo y suficiencia del cual se reconoce por medio de esta, los CEDENTES, los inventores, han vendido, traspasado,

*Beatrix Eugenia Alarcon Gutierrez*  
BEATRIZ EUGENIA ALARCON GUTIERREZ  
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL  
REGISTRADA EN EL REGISTRO DE TRADUCTORES Y  
INTERPRETES DE LA SECRETARIA DE ECONOMIA

19

101

transferido y trasladado y por medio de la presente venden, traspasan, transfieren y trasladan al CESIONARIO, la invención y solicitud anteriormente referenciada y cualquiera y todas las divisiones, continuaciones y continuaciones en parte de esta, y cualquiera y todos los títulos de patente de los Estados Unidos, sus posesiones territoriales, y cualquiera y todos los países extranjeros que por lo tanto puedan ser otorgadas, y cualquiera y todas las extensiones, republicaciones o certificados de reexamen de tales títulos de patente, que incluyen todos los derechos de prioridad y la materia objeto de cualquiera y todas las reivindicaciones que se puedan obtener en cada una de tales patentes, los mismos para ser poseídos y disfrutados por el CESIONARIO para su propio uso y beneficio, y para el uso y beneficio de sus sucesores, cedentes u otros representantes legales, hasta el fin del término o términos para el que tal título de patente es o pueda ser otorgado, extendido, republicado o reexaminado completa y enteramente como si la misma hubiera sido poseída y disfrutada por los CEDENTES si este traspaso no se hubiera hecho.

Y, por medio de la presente los CEDENTES autorizan y solicitan al comisionado de patentes a publicar cualquiera y todos los títulos de patente de los Estados Unidos sobre la invención, o que resulta de una solicitud que reivindica el beneficio de la presente solicitud, y de cualquiera y todas las divisiones y continuaciones, extensiones, republicaciones o reexaminaciones de cualquiera de tales solicitudes al CESIONARIO, y por medio de la presente convienen que ellos tienen el derecho completo a transferir el interés traspasado aquí, y que ellos no han legalizado in no legalizaran ningún acuerdo en conflicto con este.

Y, los CEDENTES por medio de la presente convienen adicionalmente y están de acuerdo en que ellos, en cualquier tiempo, luego de solicitud y a expensas del Cesionario, legalizar y suministrar cualquiera y todos los documentos que puedan ser necesarios o deseables para perfeccionar el título para la invención y solicitud y cualquier título de patente que pueda ser otorgada por lo tanto al CESIONARIO, sus sucesores, cedentes, u otros representantes legales, y que si el CESIONARIO, sus sucesores, cedentes, u otros representantes legales desean registrar cualquier división o solicitud de continuación, o asegurar una extensión, republicación o reexaminación de tal título de patente, o para registrar una renuncia relacionada con esta, solicitarán, firmar todos los documentos, hacer todos los juramentos legales, y todos los actos de

  
BEATRIZ EUGENIA ALARCON GUTIERREZ  
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL  
RESOLUCION 2512 DE SEPT. 15/92 MINISTERIO

requisito para la presentación de tal división, continuación, o solicitud de republicación, solicitud para reexaminación o renuncia sin compensación adicional.

Y los CEDENTES acuerdan adicionalmente comunicar al CESIONARIO, sus sucesores, cedentes, u otros representantes legales, tales hechos que se relacionan con la invención descrita en la presente solicitud o título de patente que se publique de esta que pueda ser conocidos, y para testificar tales hechos en cualquier interferencia u otro litigio cuando se solicite hacer eso.

Legalizado por los abajo firmantes en la fecha indicada.

Este documento se legaliza en 4/16/04

(Fecha de Registro)

|                            |          |
|----------------------------|----------|
| (Aparece firma)            | 10/10/05 |
| <hr/>                      |          |
| JOSÉ DE JESÚS DE LA FUENTE |          |
| (Aparece firma)            | 9/9/05   |
| <hr/>                      |          |
| KATHERINE M. KOCAN         |          |
| (Aparece firma)            | 9/16/05  |
| <hr/>                      |          |
| CONSUELO GARCIA-ALMAZAN    |          |
| (Aparece firma)            | 10/10/05 |
| <hr/>                      |          |
| EDMOUR F. BLOUIN           |          |

REGISTRADO 11/04/2005

PATENTE  
ROLLO 016731 CUADRO 0023

  
 BEATRIZ EDGENIA ALARCON GUTIERREZ  
 TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL  
 RESOLUCION 2512 DE SEPT. 15/93 MINJUSTICIA

ZZ

103

PA 1499862

**THE UNITED STATES OF AMERICA****TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:****UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE****United States Patent and Trademark Office****August 04, 2006**

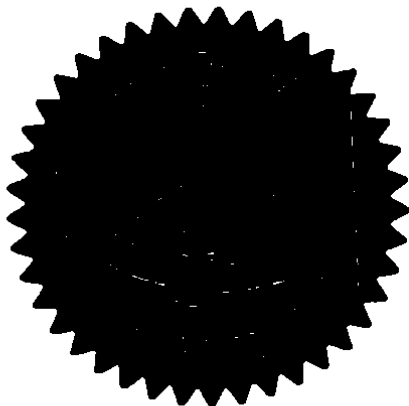
**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.**

**APPLICATION NUMBER: 11/197,133**

**FILING DATE: August 04, 2005**

**THE COUNTRY CODE AND NUMBER OF YOUR PRIORITY APPLICATION, TO BE USED FOR FILING ABROAD UNDER THE PARIS CONVENTION, IS US11/197,133**

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



*E. Bornett*  
**E. BORNETT**  
Certifying Officer

**CERTIFICATION UNDER 37 C.F.R. AND 1.10**

I hereby certify that, on the date shown below, this correspondence is being deposited with the United States Postal Service in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 as "Express Mail Post Office to Address" Mailing Label No. EV166755486US on August 4, 2005.

Luz C. Braunsteiner  
Signature

LUZ C. BRAUNSTEINER  
(type or print name of person certifying)

27 104  
PATENT  
Docket No.: 57338/05-261  
Page 1 of 9

113014 U.S. PTO  
11/197133

**Preliminary Classification:**

**Proposed Class:**

**Subclass:**

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

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

**Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450**

**NEW APPLICATION TRANSMITTAL**

Transmitted herewith for filing is the patent application of

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

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

**1. Type of Application**

This new application is for a(n)

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

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

- ☒ The new application being transmitted claims the benefit of prior U.S. application(s). This application is a continuation-in-part of corresponding application Serial No. 10/972,789, filed 10/25/2004; which in part is a continuation-in-part of corresponding application Serial No. 10/425,563, filed 04/29/2003; which in part is a non-provisional of corresponding application Serial No. 60/376,251, filed 04/29/2002.

**3. Papers Enclosed**

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

38 Pages of Specification  
2 Pages of Claims  
1 Pages of Abstract  
4 Sheets of Drawing [Formal]

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

☐ Formal  
☐ Informal

**B. Other Papers Enclosed**

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

**4. Additional Papers Enclosed**

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

**5. Declaration or Oath (including power of attorney)**

- ☐ Enclosed
- Executed by
  - ☐ inventor(s).
  - ☐ legal representative of inventor(s). 37 C.F.R. Section 1.42 or 1.43.

- ☐ joint inventor or person showing a proprietary interest on behalf of inventor who refused to sign or cannot be reached.  
☐ This is the petition required by 37 C.F.R. Section 1.47 and the statement required by 37 C.F.R. Section 1.47 is also attached. See item 13 below for fee.

☒ Not Enclosed.

- ☐ Application is made by a person authorized under 37 C.F.R. 1.41 on behalf of *all* the above named inventor(s).  
☐ Showing that the filing is authorized.

**6. Language**

- ☒ English  
☐ Non-English

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

**7. Assignment**

☒ An assignment of the invention to

- ☐ is attached. A separate  
☐ "COVER SHEET FOR ASSIGNMENT (DOCUMENT) ACCOMPANYING NEW PATENT APPLICATION" or  
☐ FORM PTO 1595 is also attached.  
☒ will follow.  
☐ Assignment previously recorded on \_\_\_\_\_ at Reel \_\_\_\_\_ / Frame \_\_\_\_\_.

**8. Certified Copy**

Certified copy(ies) of application(s)

Country:

Application No.:

Filed:

from which priority is claimed

- ☐ is (are) attached.  
☐ will follow.

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

A. Basic Filing Fees

- ☐ Basic filing fee - utility  
(Fee Code 1011/2011 — \$300.00; small entity \$150.00) \$ \_\_\_\_\_
- ☐ Basic filing fee - design  
(Fee Code 1012/2012 — \$200.00; small entity \$100.00) \$ \_\_\_\_\_
- ☐ Basic filing fee - design (CPA)  
(Fee Code 1017/2017 — \$200.00; small entity \$100.00) \$ \_\_\_\_\_
- ☐ Basic filing fee - plant  
(Fee Code 1013/2013 — \$200.00; small entity \$100.00) \$ \_\_\_\_\_
- ☐ Basic filing fee - reissue  
(Fee Code 1014/2014 — \$300.00; small entity \$150.00) \$ \_\_\_\_\_
- ☐ Basic filing fee - reissue (CPA)  
(Fee Code 1019/2019 — \$300.00; small entity \$150.00) \$ \_\_\_\_\_

B. Patent Search Fees

- ☐ Utility Search Fee  
(Fee Code 1111/2111 — \$500.00; small entity \$250.00) \$ \_\_\_\_\_
- ☐ Design Search Fee  
(Fee Code 1112/2112 — \$100.00; small entity \$50.00) \$ \_\_\_\_\_
- ☐ Plant Search Fee  
(Fee Code 1113/2113 — \$300.00; small entity \$150.00) \$ \_\_\_\_\_
- ☐ Reissue Search Fee  
(Fee Code 1114/2114 — \$500.00; small entity \$250.00) \$ \_\_\_\_\_

**C. Patent Examination Fees**

- ☐ Utility Examination Fee  
(Fee Code 1311/2311 — \$200.00; small entity \$100.00) \$ \_\_\_\_\_
- ☐ Design Examination Fee  
(Fee Code 1312/2312 — \$130.00; small entity \$65.00) \$ \_\_\_\_\_
- ☐ Plant Examination Fee  
(Fee Code 1313/2313 — \$160.00; small entity \$80.00) \$ \_\_\_\_\_
- ☐ Reissue Examination Fee  
(Fee Code 1314/2314 — \$600.00; small entity \$300.00) \$ \_\_\_\_\_

**D. Fees for claims**

- ☐ Independent claims in excess of three (3)  
(Fee Code 1201/2201 — \$200.00; small entity \$100.00) \$ \_\_\_\_\_
- ☐ Claims in excess of twenty (20)  
(Fee Code 1202/2202 — \$50.00; small entity \$25.00) \$ \_\_\_\_\_
- ☐ Multiple dependent claims  
(Fee Code 1203/2203 — \$360.00; small entity \$180.00) \$ \_\_\_\_\_

**E. Miscellaneous Fees**

- ☐ Surcharge - Late filing fee or oath or declaration  
(Fee Code 1051/2051 — \$130.00; small entity--\$65.00) \$ \_\_\_\_\_
- ☐ Submission of an Information Disclosure Statement  
(Fee Code 1806 — \$180.00 both entities) \$ \_\_\_\_\_
- ☐ Utility Application Size Fee — for each additional 50  
sheets that exceeds 100 sheets)  
(Fee Code 1081/2081 — \$250; small entity--\$125.00) \$ \_\_\_\_\_

29 110

☐ **Miscellaneous Patent Fee**  
Processing fee, except in provisional applications.  
(Fee Code 1808 — \$130.00 both entities) \$ \_\_\_\_\_  
  
Total completion fees \$ \_\_\_\_\_

**10. Small Entity Statement(s)**

☐ Small entity statement is claimed at this time.  
☒ Small entity statement is not claimed at this time.

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

*(complete, if applicable)*

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

**12. Fee Payment Being Made at This Time**

☒ Not Enclosed  
☒ No filing fee is to be paid at this time.

☐ Enclosed

|                                                                     |          |
|---------------------------------------------------------------------|----------|
| <input type="checkbox"/> Basic Filing Fees                          | \$ _____ |
| <input type="checkbox"/> Patent Search Fees                         | \$ _____ |
| <input type="checkbox"/> Patent Examination Fees                    | \$ _____ |
| <input type="checkbox"/> Fees for Claims                            | \$ _____ |
| <input type="checkbox"/> Miscellaneous Patent Fee (Processing Fee)  | \$ _____ |
| <input type="checkbox"/> Fees paid at time of filing of application | \$ _____ |

Total Fees Enclosed \$ \_\_\_\_\_

**13. Method of Payment of Fees**

- ☐ Check in the amount of \$\_\_\_\_\_.
- ☐ Charge Account No. \_\_\_\_\_ in the amount of \$ \_\_\_\_\_.  
☐ A duplicate of this request is attached.
- ☐ Charge to Credit Card the amount of \$\_\_\_\_\_.  
☐ Form PTO-2038 is attached in duplicate.
- ☐ Please charge Account No. \_\_\_\_\_ for any fees and/or deficiencies which may be due by this paper.

**14. Authorization to Charge Additional Fees**

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

**15. Instructions as to Overpayment**

- ☐ Credit Account No. \_\_\_\_\_.
- ☐ Refund

**16. Correspondence Address**

Customer No. 22206

112 25

PATENT  
Docket No.: 57338/05-261  
Page 9 of 9

Respectfully submitted,

8/4/05

DATE

Reg. No.: 36,050

Tel. No.: (918) 599-0621

Customer No.: 22206

322518.1



SIGNATURE OF PRACTITIONER

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

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

Tulsa, OK 74103-3318

2

113

# INITIAL APPLICATION DATA SHEET

## Applicati n Information

Application Type:: Regular  
Subject Matter:: Utility  
Suggested Classification::  
Suggested Group Art Unit::  
Sequence submission?:: Paper  
Computer Readable Form (CRF)?:: Yes  
Number of copies of CRF:: One  
Title:: Protective antigens and vaccines for the control of  
multi species tick infestations  
Attorney Docket Number:: 57338/05-261  
Request for Early Publication:: No  
Request for Non-Publication:: No  
Suggested Drawing Figure::  
Total Drawing Sheets:: 4  
Small Entity?:: No  
Petition Included?:: No  
Secrecy Order in Parent Appl.?:: No

## Applicant Information

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

23  
114

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

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

**Applicant Three Authority Type::** Inventor  
**Primary Citizenship Country::** Mexico  
**Status::** Full Capacity  
**Given Name::** Consuelo  
**Family Name::** García-Almazán  
**City of Residence::** Stillwater  
**State or Province of Residence::** OK  
**Country of Residence::** USA  
**Street of mailing address::** S. 81 University Place, Apt. #1  
**City of mailing address::** Stillwater

34

115

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

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

**Correspondence Information**

Correspondence Customer No.: 22208

**Representative Information**

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

**Domestic Priority Information**

| Application: | Continuity Type:     | Parent Application: | Parent Filing: |
|--------------|----------------------|---------------------|----------------|
|              | Continuation-in-part | 10/972,789          | 10/25/2004     |
| 10/972,789   | Continuation-in-part | 10/425,563          | 04/29/2003     |
| 10/425,563   | Non-Provisional of   | 60/376,251          | 04/29/2002     |

116

**Foreign Priority Information**

| Country:: | Application<br>Number:: | Filing Date:: | Priority Claimed:: |
|-----------|-------------------------|---------------|--------------------|
|           |                         |               | Yes or No          |

**Assignee Information**

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

322523.1

58  
117

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

### **CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS**

**[0001]** This application is a continuation-in-part of copending U.S. Patent Application Serial No. 10/972,789, filed October 25, 2004, which application is a continuation-in-part of copending U.S. Patent Application Serial No. 10/425,563, filed April 29, 2003, which application claims the benefit of U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/376,251 filed April 29, 2002. All noted priority applications are incorporated herein by reference.

### **BACKGROUND OF THE INVENTION**

#### **Technical Field:**

**[0002]** The present invention relates to the identification of protective antigens against tick infestations, gene sequences and encoded proteins for such antigens, related vaccines and methods useful to induce an immune response in mammals, which are protective against a broad range of tick species. This application supplements its parent application by providing additional data, including sequences derived from various tick species and strains, relating to the antigen designated 4D8.

#### **Background:**

**[0003]** Ticks parasitize wild, domesticated animals and humans and transmit pathogens including fungi, bacteria, viruses and protozoon. Currently, ticks are considered to be second in the world to mosquitoes as vectors of human diseases, but

they are considered to be the most important vector of pathogens in North America (Parola and Raoult, 2001). *Ixodes* spp. are distributed worldwide and act as vectors of human diseases caused by *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease), *Anaplasma phagocytophila* (human granulocytic ehrlichiosis), *Coxiella burnetti* (Q fever), *Francisella tularensis* (tularemia), *B. afzelli*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* and *B. garinii*, *Rickettsia helvetica*, *R. japonica* and *R. australis*, *Babesia divergens* and tick-borne encephalitis (TBE) and Omsk Hemorrhagic fever viruses (Estrada-Peña and Jongejan, 1999; Parola and Raoult, 2001). Throughout eastern and southeastern United States and Canada, *I. scapularis* (the black legged tick) is the main vector of *B. burgdorferi* sensu stricto and *A. phagocytophila* (Estrada-Peña and Jongejan, 1999; Parola and Raoult, 2001). Besides *Ixodes*, other tick species of medical and veterinary importance include those of the genera *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* and *Boophilus*.

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

[0005] Recently, vaccines have been developed against one-host *Boophilus* spp. (Willadsen, 1997; Willadsen and Jongejan, 1999; de la Fuente et al., 1999; 2000; de Vos

et al., 2001; de la Fuente and Kocan 2004). The recombinant *B. microplus* BM86 gut antigen included in commercial vaccine formulations TickGARD (Hoechst Animal Health, Australia) and Gavac (Heber Biotec S. A., Havana, Cuba) also confers partial protection against phylogenetically related *Hyalomma* and *Rhipicephalus* tick genera (de la Fuente et al., 2000; de Vos et al., 2001; de la Fuente and Kocan 2004). However, immunization with BM86 failed to protect against the more phylogenetically distant *Amblyomma* spp. (de Vos et al., 2001). These results suggest that using Bm86 or a closely related gene for the production of vaccines against *Ixodes* spp. or other tick genera phylogenetically distant from *Boophilus* spp. (Black and Piesman, 1994) could be impractical. Therefore, there remains a need to identify broad range vaccine candidates against tick infestations across phylogenetically distant species (de la Fuente and Kocan 2004).

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

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

37  
120

## SUMMARY OF THE INVENTION

[0008] In priority application Serial No. 10/425,563, numerous protective antigens derived from *I. scapularis* were identified and shown to possess protective properties against *I. scapularis* tick infestations. Among these antigens were clones and associated polypeptides designated 4D8, 4F8 and 4E6. In the immediate parent application, the activity of these particular protective antigens is demonstrated to extend to other tick species, and, in the case of 4D8, 4F8 and 4E6 to non-*Ixodes* tick species. In addition, there is provided the recently discovered sequences (DNA and protein) of tick protective antigen 4D8 derived from genus *Rhipicephalus*, particularly *Rhipicephalus appendiculatus*. In this application, additional sequences and data derived from other tick species of the genera *Boophilus*, *Dermacentor*, *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, and *Haemaphysalis* relating to the antigen designated 4D8 are provided, together with homology comparisons.

[0009] Sequence conservation and expression of 4F8, 4D8 and 4E6 were analyzed in *I. scapularis* related species, *I. pacificus* and *I. ricinus*, and in *D. variabilis*, *R. sanguineus*, *B. microplus* and *A. americanum* by RT-PCR using the primers specific for the known *I. scapularis* sequences. Expression was detected in *I. ricinus* for all three genes and in *I. pacificus* for 4D8 and 4E6. Expression of 4D8 was also detected in *D. variabilis*, *B. microplus*, *R. sanguineus* and *A. americanum*. Corresponding 4D8 genes of *D. variabilis*, *A. americanum* and *B. microplus* were cloned and sequenced. In this application, additional data on 4D8 sequence conservation is provided on Table 8.

[0010] The detection of 4D8 and 4E6 expression in non-*Ixodes* tick species were the basis for an experiment in which rabbits were immunized with *I. scapularis* derived

42  
121

4F8, 4D8 and 4E6 and challenged with *I. scapularis*, *D. variabilis* and *A. americanum* nymphs. Results support using the inventive protective antigens in vaccine formulations for the control of multiple tick species.

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

[0012] In another embodiment of the present invention there is provided a vaccine composition comprising the inventive protective recombinant proteins and/or modified cDNAs separately or which may optionally be combined with adjuvant to enhance the protection efficacy of vaccine preparations against multiple tick species, wherein the vaccine composition further comprises a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. The vaccine composition also may optionally be combined with tick-borne pathogen components to provide a means to control tick-borne infections, wherein the vaccine composition further comprises a pharmaceutically acceptable carrier or diluent and adjuvant.

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

infestations and to reduce transmission to humans of tick-borne infections, wherein the vaccine composition further comprises a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

[0014] A better understanding of the present invention and its objects and advantages will become apparent to those skilled in this art from the following detailed description, wherein there is described only the preferred embodiment of the invention, simply by way of illustration of the best mode contemplated for carrying out the invention. As will be realized, the invention is capable of modifications in various obvious respects, all without departing from the scope and spirit of the invention. Accordingly, the description should be regarded as illustrative in nature and not as restrictive.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

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

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

[0017] FIG. 2B is a graph depicting the results of a primary screen of cDNA pools (A6-A10, B-H 5-8) by ELI. V, control mice injected with 1 µg vector DNA alone. \* $\alpha < 0.01$ , \*\* $\alpha < 0.05$  (Tukey's *post-hoc* test for pair comparisons after ANOVA). Number

42  
123

in boxes represent values for inhibition of tick infestation with respect to the control group.

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

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

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

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

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

123

124

### **Tick cells**

[0021] Monolayers of IDE8 (ATCC CRL 1973) cells, originally derived from embryonic *I. scapularis*, were maintained at 31°C in L-15B medium supplemented with 5% foetal bovine serum, tryptose phosphate broth and bovine lipoprotein concentrate after Munderloh et al. (1994). Cells were subcultured at 1:5 – 1:10 when monolayers reached a density of approximately  $10^7$  cells/T-25 flask. Medium was replaced weekly.

### **Library construction**

[0022] A cDNA expression library was constructed in the vector pEXP1 containing the strong cytomegalovirus CMV<sub>IE</sub> promoter (Clontech). Because we planned to target the early larval stages of *I. scapularis*, we chose to construct our library from cultured embryonic *I. scapularis* IDE8 cells-derived poly(A)<sup>+</sup> RNA. The cDNA library contained  $4.4 \times 10^6$  independent clones and a titer of approximately  $10^{10}$  cfu/ml with more than 93% of the clones with cDNA inserts. The average cDNA size was 1.7 kb (0.5–4.0 kb).

### **Primary screen**

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

[0024] Ninety-six LBA (master) plates containing an average of 41 (30–61) cDNA clones per plate were prepared. Replicas were made and clones from each plate were pooled, inoculated in Luria-Bertani with 50 µg/ml ampicillin, grown for 2 hr in a 96 wells plate and plasmid DNA purified from each pool (Wizard SV 96 plasmid DNA purification system, Promega, Madison, WI, USA). BALB/c female mice, 5–6 weeks of age at the time of first vaccination, were used. Mice were cared for in accordance with

~~48~~  
125

standards set in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Mice were injected with a 1 ml tuberculin syringe and a 27 gauge needle at days 0 and 14. Three mice per group were each immunized IM in the thigh with 1 µg DNA/dose in 50 µl PBS. Two groups of 3 mice each were included as controls. One group was injected with 1 µg vector DNA alone and the second with saline only. Two weeks after the last immunization, mice were infested with 100 *I. scapularis* larvae per mouse. Ticks were artificially reared at the Oklahoma State University tick rearing facility by feeding larvae on mice, nymphs on rabbits and adults on sheep and using for infestation in our experiments the larvae obtained from the eggs oviposited by a single female. Twelve hours after tick infestation, larvae that did not attach were counted to calculate the number of attached larvae per mouse and mice were transferred to new cages. Replete larvae dropping from each mouse were collected daily and counted during 7 days. The inhibition of tick infestation (I) for each test group was calculated with respect to vector-immunized controls as  $[1 - (\frac{n}{c} \times \frac{ic}{in})] \times 100$ , where  $n$  is the average number of replete larvae recovered per mouse for each test group,  $c$  is the average number of replete larvae recovered per mouse for control group,  $ic$  is the average number of larvae attached per mouse for control group, and  $in$  is the average number of larvae attached per mouse for each test group.

[0025] Pools of 41 (30-61) *I. scapularis* cDNA clones were screened by ELI. Only 33 cDNA pools and controls were analyzed per experiment. The average tick infestation level was  $50 \pm 13$  and  $56 \pm 15$  and  $56 \pm 15$  and  $54 \pm 18$  larvae/mouse for cDNA immunized and control mice, respectively ( $P > 0.05$ ) (Table 1). The average number of engorged larvae recovered per mouse was  $9 \pm 3$  and  $13 \pm 4$  in the cDNA-immunized mice

45

126

and  $16 \pm 4$  and  $17 \pm 3$  in the control vector-immunized group ( $P < 0.05$ ) (Table 1). No reduction was observed in the number of larvae collected from mice that received the vector DNA compared to saline-immunized controls. The maximum number of engorged larvae was collected 3 to 4 days after infestation. However, in mice immunized with cDNA pools B5, A8 and A10 (Fig. 2) a retardation of larval development in 1 to 2 days was recorded. The average inhibition of tick infestation (I) was  $49 \pm 28\%$  and  $30 \pm 22\%$  (Table 1). After two experiments covering the analysis of 66 pools (2705 clones), 9 protective pools (351 clones) were selected producing an inhibition of tick infestation  $\geq 60\%$  (Fig. 2A and 2B and Table 1). When we started these experiments, we planned to screen over 4000 cDNA clones considering the complexity of the tick genome. However, to our surprise 9 protective cDNA pools were identified after screening 66 pools containing 2705 cDNA clones. This result probably reflects the possibility of interfering with tick infestations at many different levels that involve a Pleiades of gene products. Results from vaccination experiments against ticks employing recombinant antigens support this view (reviewed by Mulenga et al., 2000). Because of the complexity of the screening procedure in mice vaccinated and challenged with tick larvae, it was difficult to work with more than 9 protective cDNA pools. Therefore we did not continue screening new cDNA pools and focused our attention on the 9 pools selected after the primary screen.

#### *Secondary screen*

[0026] The secondary screen was done to verify the protective capacity of the cDNA pools selected after the primary screen (Fig. 2A and 2B). After the primary screen of 66 cDNA pools (2705 clones), 9 pools with  $\geq 60\%$  were selected for the secondary

46  
127

screen (re-screening) employing 5 mice per group as described above. Engorged larvae were kept for molting in a 95% humidity atmosphere. Molting of engorged larvae was evaluated by visual examination of tick nymphs under a stereomicroscope 34 days after last larval collection. The inhibition of molting (M) for each test group was calculated with respect to vector-immunized controls as  $[1-(ML_n/ML_c \times RL_c/RL_n)] \times 100$ , where  $ML_n$  is the number of nymphs for each test group,  $ML_c$  is the number of nymphs for the control group,  $RL_c$  is the number of larvae recovered for the control group, and  $RL_n$  is the number of larvae recovered for each test group. Control mice were immunized with the negative (I=0%) F2 cDNA pool or saline only. A group was included immunized SC with two doses of 100  $\mu$ g of total IDE8 tick cell proteins per dose in Freund's incomplete adjuvant.

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

[0028] In the secondary screen, molting of engorged larvae was evaluated after 34 days. Molting was affected in all but one test cDNA-immunized group. Inhibition of molting in test cDNA-immunized mice compared to the control cDNA-immunized group

8.7

128

varied from 0% to 12% ( $6\pm4\%$ ). The inhibition of molting was higher than 50% only in the larvae collected from mice immunized with cDNA pools B5 and A10, which showed a retardation of larval development in 1 to 2 days as in the primary screen. No differences were observed between control cDNA and saline-immunized mice. Among the larvae that did not molt to nymph, some were visibly damaged and presented a strong red coloration. The percent of red larvae in cDNA-immunized mice varied between 3% to 18% ( $7\pm5\%$ ) while in the saline and control cDNA-immunized groups red larvae represented the 6% and 4%, respectively.

#### ***Tertiary screen***

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

[0030] Tick infestation levels were similar in all test groups ( $72\pm2$  larvae/mouse) and in control mice ( $69\pm2$  larvae/mouse) ( $P>0.05$ ). The number of engorged larvae recovered per mouse was also similar between test ( $16\pm7$ ) and control ( $14\pm6$ ) mice ( $P>0.05$ ). However, the groups immunized with cDNA sub-pools containing clones with putative endopeptidase, nucleotidase, ribosomal proteins, heat shock proteins, glutamine-alanine-rich proteins and 3 of the sub-pools with unknown function or with sequences without homology to sequence databases had  $\geq 15\%$  (Fig. 3). Furthermore, among them,

the groups immunized with sub-pools containing clones with a putative endopeptidase, nucleotidase and two of the cDNA sub-pools with unknown function or with sequences without homology to sequence databases resulted in lower infestation levels compared to control mice ( $P \leq 0.05$ ) and  $I \geq 40\%$  (Fig. 3). Clones homologous to chorion proteins, vitellogenin receptors, and peptidoglycan recognition proteins were selected for their potential protection capacity in other stages of tick development.

#### *Statistical analysis*

[0031] The number of larvae attached per mouse and the number of engorged larvae recovered per mouse 7 days after infestation were compared by Analysis of Variance (ANOVA) followed by a series of Tukey's *post-hoc* tests for pair comparisons between cDNA-immunized and control vector DNA-immunized mice (primary screen), and by Student's t-test between mice immunized with positive cDNA pools and the control negative F2 cDNA pool (secondary screen) or between test cDNA sub-pools-immunized and control mice immunized with mitochondrial cDNAs (tertiary screen).

#### *Example 2: Sequence analysis of protective clones*

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

8

131

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

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

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

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

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

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

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

57

132

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

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

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

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

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

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

**Methods**

***RNA extraction and reverse transcription (RT)-PCR***

[0048] Total RNA was extracted from guts and salivary glands dissected from 30 unfed *I. scapularis* females, approximately 100 and 1000 *I. scapularis* nymphs and larvae, respectively, the egg mass oviposited by one *I. scapularis* female, salivary glands dissected from 10 *D. variabilis* males, salivary glands and guts dissected from 20 *A. americanum* and *R. sanguineus* adults, 10 *B. microplus* adults and 10 *I. pacificus* females,

SV  
133

respectively and 100-150 *I. ricinus* larvae. Total RNA was extracted from homogenized tick samples using TRI Reagent (Sigma), except for *I. ricinus* and *B. microplus* RNA which were extracted using the RNA Instapur kit (Eurogentec, Seraing, Belgium) and the RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), respectively, according to the manufacturer's instructions. The final RNA pellet was resuspended in 50-100 µl diethyl pyrocarbonate-treated distilled deionized sterile water. RT-PCR reactions were performed using the Access RT-PCR system (Promega, Madison, WI, USA). One µl RNA was reverse transcribed in a 50 µl reaction mixture (1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 X avian myeloblastosis virus (AMV) RT/*Thermus flavus* (TfI) reaction buffer, 10 mM random hexamer, 0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 5 U AMV RT, 5u TfI DNA polymerase (Promega), 10 pmol of each primer) at 48°C for 45 min. After 2 min incubation at 94°C, PCR was performed in the same reaction mixture with specific primers and amplification conditions (Table 5). Control reactions were performed using the same procedures but without RT to control for DNA contamination in the RNA preparations and without RNA added to control contamination of the PCR reaction. Positive control reactions for the PCR were performed with plasmid DNA containing the cloned tick cDNAs and with genomic DNA extracted from *I. scapularis* IDE8 cells. PCR products were electrophoresed on 1% agarose gels to check the size of amplified fragments by comparison to a DNA molecular weight marker (1 Kb Plus DNA Ladder, Promega).

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

[0049] Fragments of the *D. variabilis*, *A. americanum* and *B. microplus* 4D8 cDNA were amplified by RT-PCR and cloned into pGEM-T (Promega). Four clones of

53  
134

each were sequenced at the Core Sequencing Facility, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Noble Research Center, Oklahoma State University.

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

[0050] An experiment was designed to evaluate the effect of tick protective antigens on nymphal stages of *I. scapularis*, *D. variabilis* and *A. americanum*. One New Zealand White rabbit per group was each immunized with 3 doses (weeks 0, 4 and 7) containing 50 µg/dose purified 4F8 and 4D8 proteins or 4E6 synthetic peptide derived from *I. scapularis*, a combination of 4F8+4D8+4E6 or bovine serum albumin (Sigma) as control in FIA (Sigma). Animals were cared for in accordance with standards specified in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Rabbits were injected subcutaneously with 500 µl/dose using a 1 ml tuberculin syringe and a 27½G needle. Two weeks after the last immunization, rabbits were infested with 100 *I. scapularis* nymphs per rabbit in one ear and 110 nymphs of each *D. variabilis* and *A. americanum* on the other ear. The number of nymphs attached was recorded and engorged nymphs dropping from each rabbit's ear were collected daily and counted during 7 days. *D. variabilis* and *A. americanum* engorged nymphs were separated under a dissecting light microscope. Engorged nymphs collected after completion of the feeding period were counted and weighted. The inhibition of tick nymphal infestation was calculated with respect to the control group as described previously for larval tick infestations (Almazán et al., 2003). The reduction on the weight of engorged nymphs was determined in experimental groups with respect to the nymphs collected from the control group.

**Results**

3

135

### ***Expression of protective cDNAs***

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

[0052] Sequence conservation and expression of 4F8, 4D8 and 4E6 were analyzed in *I. scapularis* related species, *I. pacificus* and *I. ricinus*, and in *D. variabilis*, *R. sanguineus*, *B. microplus* and *A. americanum* by RT-PCR (Table 6) using the primers derived from *I. scapularis* sequences (Table 5). Expression was detected in *I. ricinus* for all three genes and in *I. pacificus* for 4D8 and 4E6. Expression of 4D8 was also detected in *D. variabilis*, *B. microplus*, *R. sanguineus* and *A. americanum*.

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

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

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

58

136

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

\* \* \* \* \*

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

[0056] Nucleotide and amino acid sequences relating to the protective antigen denominated 4D8 were determined for additional tick species and strains. 4D8 cDNAs and corresponding amino acid sequences are provided in SEQ ID NOS: 40-62 for *I. ricinus*, *B. microplus* Cepich, *B. microplus* Muñoz, *B. microplus* S. Lulsa, *R. sanguineus*, *D. marginatus*, *Hy. m. marginatum* 1, *Hy. m. marginatum* 2, and *H. punctata*, together with a sequence listing for the 4D8 coding region of *I. scapularis* (SEQ. ID NO: 40) and sequences representing the full 4D8 cDNA and corresponding amino acid for *D. variabilis* (SEQ. ID NOS: 47 and 58). Nucleotide and amino acid identity/similarity as

56  
137

established by pairwise comparisons of tick 4D8 sequences is provided in Table 8. Sequences were aligned and percent homology was determined using the program AlignX (Vector NTI Suite V 5.5, InforMax, North Bethesda, MD, USA. As noted therein, the various 4D8 sequences are fairly conserved, with homologies ranging from 60-99%.

[0057] Thus, the present invention relates to the identification of these antigens which are protective against a broad range of tick species, gene sequences and encoded proteins for such antigens, related vaccines and methods useful to induce an immune response. More generally, the invention concerns the given cDNA sequences and any nucleotide sequence coding for a protein which is capable of eliciting an antibody or other immune response (e.g., T-cell response of the immune system) which recognizes an epitope(s) of the amino acid sequences depicted in the Sequence Listing, including less than the full cDNA sequences and mutants thereof. Hence the nucleotide sequence may encode a protein which is the entire antigen encoded by the variously identified bases, or a fragment or derivative of the antigen or a fusion product of the antigen or fragment and another protein, provided that the protein which is produced from such sequence is capable of eliciting an antibody or other immune response which recognizes an epitope(s) of the given amino acid sequences.

[0058] As a result, the invention encompasses DNA sequences which encode for and/or express in appropriate transformed cells, proteins which may be the full length antigen, antigen fragment, antigen derivative or a fusion product of such antigen, antigen fragment or antigen derivative with another protein.

**[0059]** As will be appreciated by those of ordinary skill in the art, a nucleotide sequence encoding the inventive antigens or variants thereof may differ from the native sequences presented herein due to codon degeneracies, nucleotide polymorphisms, or nucleotide substitutions, deletions or insertions. While several embodiments of such molecules are depicted in the Sequence Listing, it should be understood that within the context of the present invention, reference to one or more of these molecules includes variants that are naturally occurring and/or synthetic sequences which are substantially similar to the sequences provided herein and, where appropriate, the protein (including peptides and polypeptides) that are encoded by these sequences and their variants. As used herein, the nucleotide sequence is deemed to be "substantially similar" if: (a) the nucleotide sequence is derived from the coding region of a native gene of the various noted tick species and encodes a peptide or polypeptide possessing the described antigenicity (including, for example, portions of the sequence or allelic variations of the provided sequences); or (b) the nucleotide sequences are degenerate (i.e., sequences which encode the same amino acid using a different codon sequence) as a result of the genetic code to the nucleotide sequences defined in (a); or (c) the nucleotide sequence is at least 60% identical to a nucleotide sequence provide herein, or (d) is a complement of any of the sequences described in (a-c).

**[0060]** Proteins included within the present invention have an amino acid sequence depicted in the Sequence Listing and homologs thereof. Other included proteins consist of a fragment of said sequence capable of eliciting an antibody or other immune response which recognizes an epitope(s) of the amino acid sequences depicted and a mutant of said sequence capable of eliciting an antibody or other immune response

258  
139

which recognizes an epitope(s) of such amino acid sequences. A variant should preferably have at least 60% amino acid sequence homology. As used herein, amino acid "homology" is determined by a computer algorithm incorporated in a protein database search program commonly used in the art, for example, as incorporated in the programs AlignX (Vector NTI Suite V 5.5, InforMax, North Bethesda, MD, USA), BLAST (BLAST.TM., a computer program) (Altschul et al., Nucleic Acids Res. (25) 3389-3402, 1997) or DNA STAR MEGALIGN (DNA STAR MEGALIGN.TM., a computer program) which return similar results in homology calculations.

[0061] The nucleotide sequences may be inserted into any of a wide variety of expression vectors by a variety of procedures. Such procedures and others are deemed to be known by those skilled in the art. Suitable vectors include chromosomal, nonchromosomal and synthetic DNA sequences; e.g., derivatives of SV40; bacterial plasmids; phage DNAs; yeast plasmids; vectors derived from combinations of plasmids and phage DNAs, viral DNA such as baculovirus, vaccinia, adenovirus, fowl pox virus, pseudorabies, etc. The appropriate DNA sequence must be operatively linked in the vector to an appropriate expression control sequence(s) (promoter) to direct mRNA synthesis. As representative examples of such promoters, there may be mentioned LTR or SV40 promoter, the E. coli lac or trp, the phage lambda PL promoter and other promoters known to control expression of genes in prokaryotic and eukaryotic cells or their viruses. The expression vector also includes a non-coding sequence for a ribosome binding site for translation initiation and a transcription terminator. The vector may also include appropriate sequences for amplifying expression.

5  
140

[0062] The vector containing the appropriate cDNA sequence as hereinabove described, as well as an appropriate promoter or control sequence, may be employed to transform an appropriate host to permit the host to express the protein. Examples of host organisms and cells include bacterial strains (e.g., *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Salmonella*, etc.), fungi (e.g., yeasts and other fungi), animal or plant hosts (e.g., mouse, swine or animal and human tissue cells). The selection of the host is deemed to be within the scope of those skilled in the art.

[0063] It is also understood that the appropriate cDNA sequence present in the vector when introduced into a host may express part or only a portion of the protein which is encoded within the noted terminology, it being sufficient that the expressed protein be capable of eliciting an antibody or other immune response which recognizes an epitope(s) of the listed amino acid sequences.

[0064] The isolated cDNAs and/or polypeptide expressed by the host transformed by the vector may be harvested by methods which will occur to those skilled in the art and used in a vaccine for protection of a mammal, such as dogs, cattle, humans, etc., against infestations of *Ixodes* and non-*Ixodes* tick species. Such protective recombinant proteins and/or modified cDNAs are used in an amount effective to induce an immune response against such ticks and their associated pathogens and may be used in combination with a suitable physiologically acceptable carrier. The term "inducing an immune response" when used with respect to the vaccine described herein means that the vaccine prevents disease associated with a particular tick species or reduces the severity of the disease.

6  
141

[0065] The carrier employed in conjunction with vaccine may be any one of a wide variety of carriers. As representative examples of suitable carriers, there may be mentioned mineral oil, synthetic polymers, etc. Carriers for vaccines are well known in the art and the selection of a suitable carrier is deemed to be within the scope of those skilled in the art. The selection of a suitable carrier is also dependent upon the manner in which the vaccine is to be administered.

[0066] The present invention provides a method of immunizing a susceptible mammal, against infestations and disease caused by ticks with the vaccine described above. For purposes of this invention, the vaccine is administered in an effective amount. The vaccine may be administered by any of the methods well known to those skilled in the art, for example, by intramuscular, subcutaneous, intraperitoneal or intravenous injection. Alternatively, the vaccine may be administered intranasally or orally. It is also to be understood that the vaccine may include active components, such as tick-borne pathogen components or adjuvants in addition to the antigen(s) or fragments hereinabove described.

[0067] The host expressing the antigen may itself be used to deliver antigen to non-human animals, by introducing killed or viable host cells that are capable of propagating in the animal. Direct incorporation of the cDNA sequences into host cells may also be used to introduce the sequences into animal cells for expression of antigen in vivo.

68  
142

### ***Bibliography***

The following references are incorporated herein by reference:

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

143

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

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

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

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

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

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

- De Rose R, McKenna RV, Cobon G, Tennent J, Zakrzewski H, Gale K, Wood PR, Scheerlinck JP, Willadsen P. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 71: 151-60.
- de Vos S, Zeinstra L, Taoufik O, Willadsen P, Jongejan F. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Exp Appl Acarol* 2001; 25: 245-61.
- Drew DR, Lightowlers M, Strugnell RA. Vaccination with plasmid DNA expressing antigen from genomic or cDNA gene forms induces equivalent humoral immune responses. *Vaccine* 1999; 18: 692-702.
- Elad D, Segal E. Immunogenicity in calves of a crude ribosomal fraction of *Trichophyton verrucosum*: a field trial. *Vaccine* 1995; 13: 83-7.
- Estrada-Peña A, Jongejan F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Exp Appl Acarol* 1999; 23: 685-715.
- Garcia-Garcia JC, Gonzalez IL, Gonzalez DM, Valdes M, Mendez L, Lamberti J, D'Agostino B, Citroni D, Fragoso H, Ortiz M, Rodriguez M, de la Fuente J. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol* 1999; 23: 883-95.
- Kofia W, Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Vet Parasitol* 2001; 100: 3-12.

6A  
145

- Liyou N, Hamilton S, Elvin C, Willadsen P. Cloning and expression of ecto 5'-nucleotidase from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Insect Mol Biol* 1999; 8: 257-66.
- Liyou N, Hamilton S, Mckenna R, Elvin C, Willadsen P. Localization and functional studies on the 5'-nucleotidase of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Appl Acarol* 2000; 24: 235-46.
- Manoutcharian K, Terrazas LI, Gevorkian G, Govezensky T. Protection against murine cysticercosis using cDNA expression library immunization. *Immunol Lett* 1998; 62: 131-6.
- Melby PC, Ogden GB, Flores HA, Zhao W, Geldmacher C, Biediger NM, Ahuja SK, Uranga J, Melendez M. Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. *Infect Immun* 2000; 68: 5595-602.
- Moore RJ, Lenghaus C, Sheedy SA, Doran TJ. Improved vectors for expression library immunization—application to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Vaccine* 2001; 20: 115-20.
- Mulenga A, Sugimoto C, Onuma M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes Infect* 2000; 2: 1353-61.
- Munderloh UG, Wang YLM, Chen C, Kurti TJ. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J Parasitol* 1994; 80: 533-43.

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

15  
147

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

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

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

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

<sup>c</sup>Engorged larvae dropping from each mouse were collected daily and counted after 7 days.

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

67  
148

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

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

<sup>a</sup>Eliminated from further screening of protective antigens. Other clones were eliminated for containing similar sequences.

<sup>b</sup>Except for ribosomal proteins.

68  
149

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

| <b>Sub-pool (No. of clones)</b>       | <b>Clone</b>                                                                                            | <b>Pool<sup>a</sup></b>                 |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Ribosomal (17)</b>                 | 1A2, 1A10, 1C11<br>1F6<br>2B8<br>2F8, 2F10<br>3A10, 2C3, 3D2, 3D10<br>3G9, 3G10<br>4D11, 4D12, 4E7, 4F7 | A5<br>D1<br>A10<br>E8<br>B4<br>E3<br>F1 |
| <b>Membrane protein (7)</b>           | 1D8, 1D11, 1E10<br>2B12<br>2H5<br>3C9<br>3G11                                                           | D1<br>A10<br>E8<br>B4<br>E3             |
| <b>ATPase (6)</b>                     | 1A9, 1B2, 1C9<br>2C9<br>4A4<br>4G12                                                                     | A5<br>A10<br>C3<br>F1                   |
| <b>Cell channel/Transporter (5)</b>   | 1F4<br>2H11<br>4A12<br>4G10, 4G11                                                                       | D1<br>E8<br>C3<br>F1                    |
| <b>Early development-specific (4)</b> | 1C8<br>3F4<br>4C7<br>4G9                                                                                | A5<br>E3<br>C3<br>F1                    |
| <b>G protein-coupled receptor (4)</b> | 2B7, 2C12<br>2F12<br>4C9                                                                                | A10<br>E8<br>C3                         |
| <b>Growth factor receptor (3)</b>     | 2E8<br>3B8, 3C8                                                                                         | B5<br>B4                                |
| <b>Lectin (3)</b>                     | 3E10<br>4B8, 4C8                                                                                        | E3<br>C3                                |
| <b>Vitellogenin (3)</b>               | 1F12<br>4A6<br>4G2                                                                                      | D1<br>C3<br>F1                          |
| <b>Heat shock (3)</b>                 | 1C10<br>1F10<br>3F6                                                                                     | A5<br>D1<br>E3                          |
| <b>EGF-like (2)</b>                   | 2H4<br>4C10                                                                                             | E8<br>C3                                |
| <b>Secreted protein (2)</b>           | 2F9<br>3C12                                                                                             | E8<br>B4                                |
| <b>Glutamine-Alanine rich (2)</b>     | 4D6, 4E6                                                                                                | F1                                      |
| <b>Adaptin (1)</b>                    | 3E1                                                                                                     | E3                                      |
| <b>Endopeptidase (1)</b>              | 4D8                                                                                                     | F1                                      |
| <b>Nucleotidase (1)</b>               | 4F8                                                                                                     | F1                                      |

<sup>a</sup>cDNA pools refer to positive pools after primary and secondary screens (Fig. 2A and 2B).

64  
150

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

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

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

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

151

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

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

<sup>a</sup>PCR conditions are indicated for denaturing, annealing and polymerization steps, respectively.

<sup>b</sup>Calculated from the sequence of the cDNA insert.

<sup>c</sup>Estimated from the PCR of IDE8 genomic DNA.

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

| RNA source | <i>I. scapularis</i> |                |                |                |                |                | <i>I. pacificus</i> | <i>I. ricinus</i> | <i>A. americanus</i> | <i>D. variabilis</i> | <i>R. sanguineus</i> | <i>B. microplus</i> |
|------------|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
|            | IDE8                 | salivary gland | salivary gland | salivary gland | salivary gland | salivary gland |                     |                   |                      |                      |                      |                     |
| Clone      | mRNA expression      |                |                |                |                |                |                     |                   |                      |                      |                      |                     |
| 4F8        | +                    | +              | +              | +              | +              | +              | -                   | +                 | -                    | -                    | -                    | -                   |
| 4D8        | +                    | +              | +              | +              | +              | +              | +                   | +                 | +                    | +                    | +                    | +                   |
| 4E6        | +                    | +              | +              | +              | +              | +              | +                   | +                 | +                    | -                    | -                    | -                   |

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

27  
152

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

| Tick species         | Inhibition of tick nymphal infestation (%) <sup>a</sup> |     |     |     | Reduction in the weight of engorged nymphs (%) <sup>b</sup> |     |     |     |
|----------------------|---------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|                      | 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  |

<sup>a</sup>Determined with respect to the number of engorged nymphs recovered from the control group as described above for tick larval infestations.

<sup>b</sup>Average weight per engorged nymph with respect to the weight of nymphs collected from the control group.

Table 8. Nucleotide (above diagonal) and amino acid (below diagonal) identity/similarity for all pairwise comparisons of tick 4D8 sequences.

|                                        | <i>I. s</i> | <i>A. a</i> | <i>R. a</i> | <i>Hy. m</i><br>1 | <i>Hy. m</i><br>2 | <i>R. s</i> | <i>I. r</i> | <i>R. m</i><br><i>S. Luisa</i> | <i>R. m</i><br><i>Cepich</i> | <i>R. m</i><br><i>Muñoz</i> | <i>R. m</i><br><i>Susceptible</i> | <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> <i>S. Luisa</i>    | 60          | 78          | 85          | 86                | 86                | 90          | 64          | 100                            | 100                          | 100                         | 99                                | 80          | 80          | 68          |
| <i>B. microplus</i> <i>Cepich</i>      | 60          | 78          | 85          | 86                | 86                | 90          | 64          | 100                            | 100                          | 99                          | 99                                | 80          | 80          | 68          |
| <i>B. microplus</i> <i>Muñoz</i>       | 60          | 78          | 85          | 86                | 86                | 90          | 64          | 100                            | 100                          | 100                         | 99                                | 80          | 80          | 68          |
| <i>B. microplus</i> <i>Susceptible</i> | 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         |

Sequences were aligned and percent identity/similarity was determined using the program AlignX (Vector NTI Suite V 5.5, InforMax, North Bethesda, MD, USA). Values for *R. microplus* strain sequence comparisons are contained within the squared area.

28

[0068] In view of the above, it will be seen that the several objectives of the invention are achieved and other advantageous results attained. As various changes could be made in the above DNA molecules, proteins, etc. without departing from the scope of the invention, it is intended that all matter contained in the above description or shown in the accompanying drawings shall be interpreted as illustrative and not in a limiting sense. While the invention has been described with a certain degree of particularity, it is understood that the invention is not limited to the embodiment(s) set forth herein for purposes of exemplification, but is to be limited only by the scope of the attached claim or claims, including the full range of equivalency to which each element thereof is entitled.

~~155~~  
155

**WHAT IS CLAIMED IS:**

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence that is at least 60% homologous to at least one of SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO:39; or SEQ. ID NOS. 52 through 62.
2. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:4.
3. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:27.
4. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:29.
5. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:31.
6. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:39.
7. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:52.
8. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:53.
9. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:54.
10. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:55.

156

11. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:56.

12. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:57.

13. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:58.

14. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:59.

15. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:60.

16. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:61.

17. The polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:62.

18. A multi species anti-tick vaccine composition comprising a polypeptide of claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

19. A method of inducing an immune response in a mammal against multi species tick infestation and their associated pathogens, comprising administering to the mammal the vaccine of claim 18.

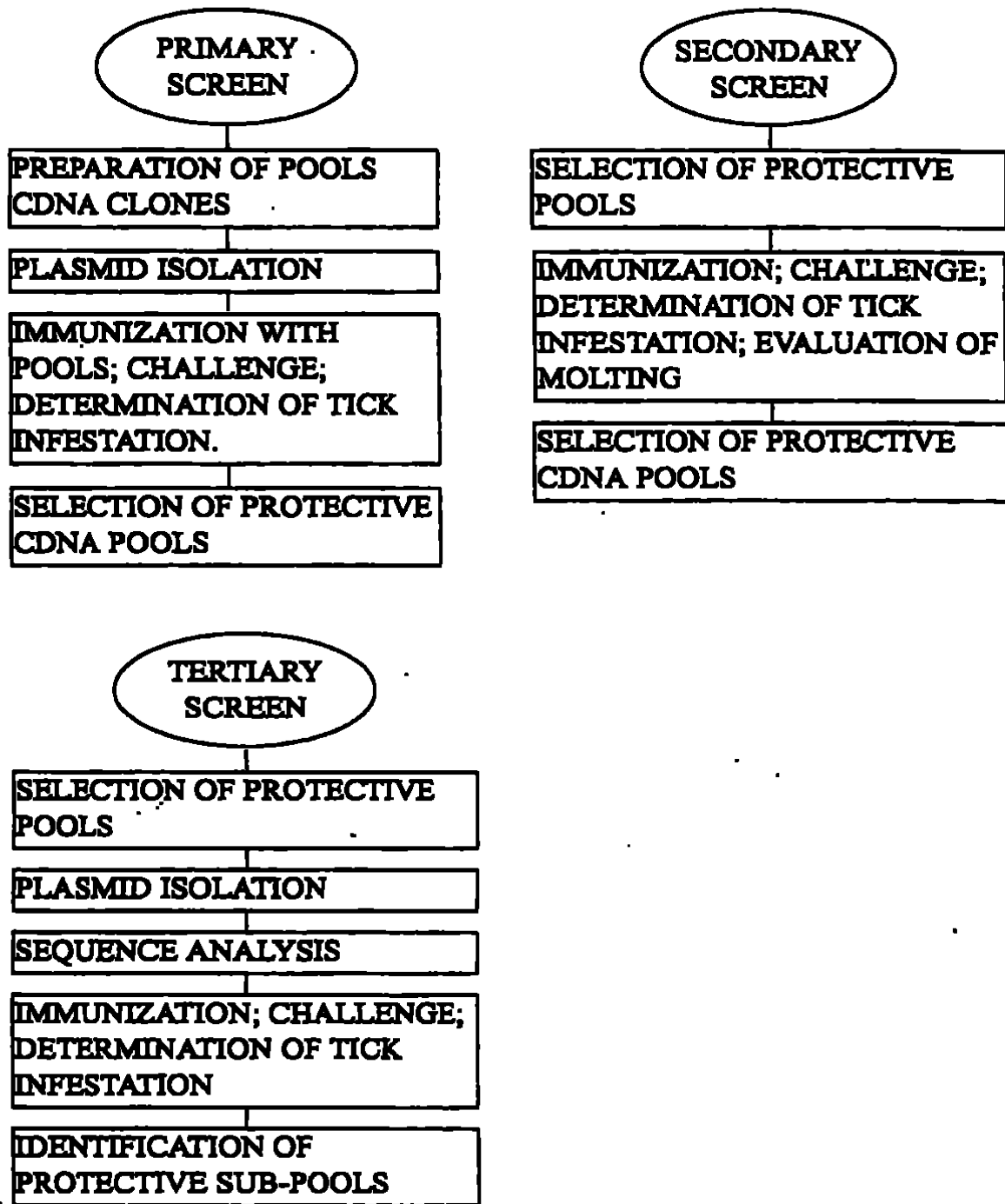
26  
157

### **ABSTRACT OF THE DISCLOSURE**

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

**W #322540 v1**

FIG. 1



159

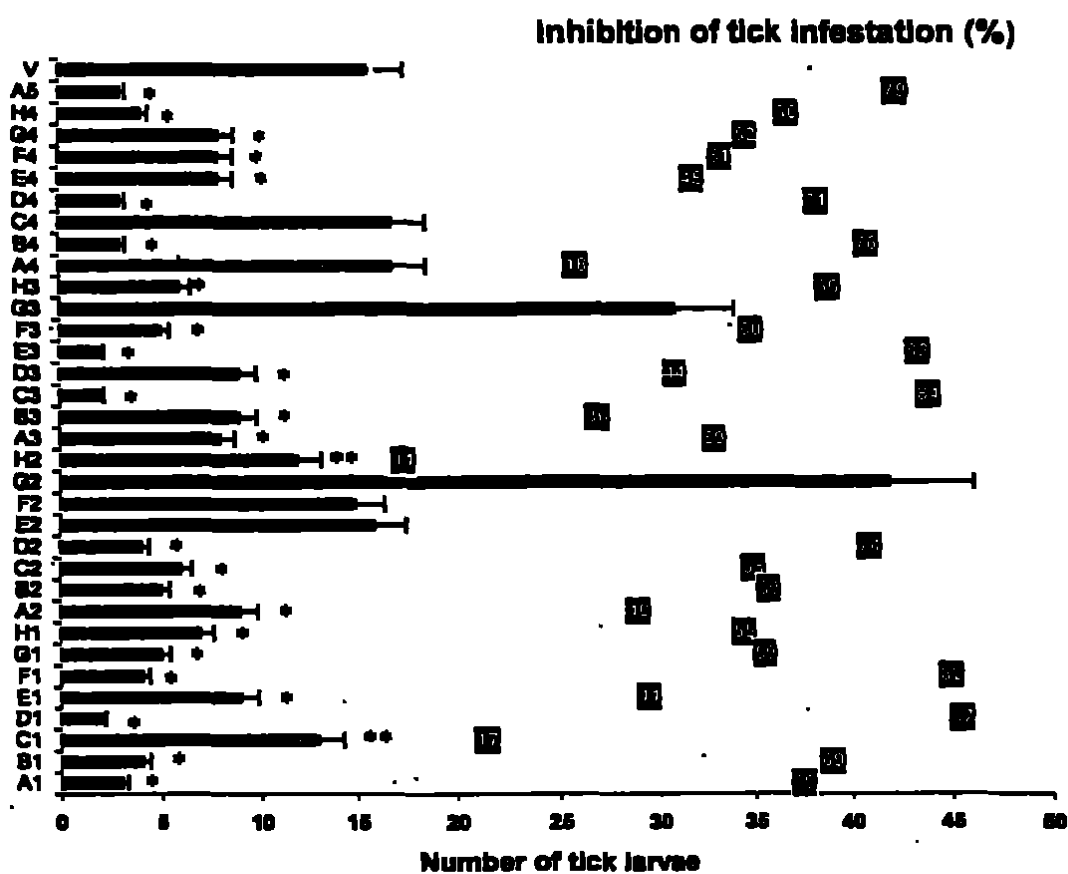


FIG. 2A

BEST AVAILABLE COPY

160

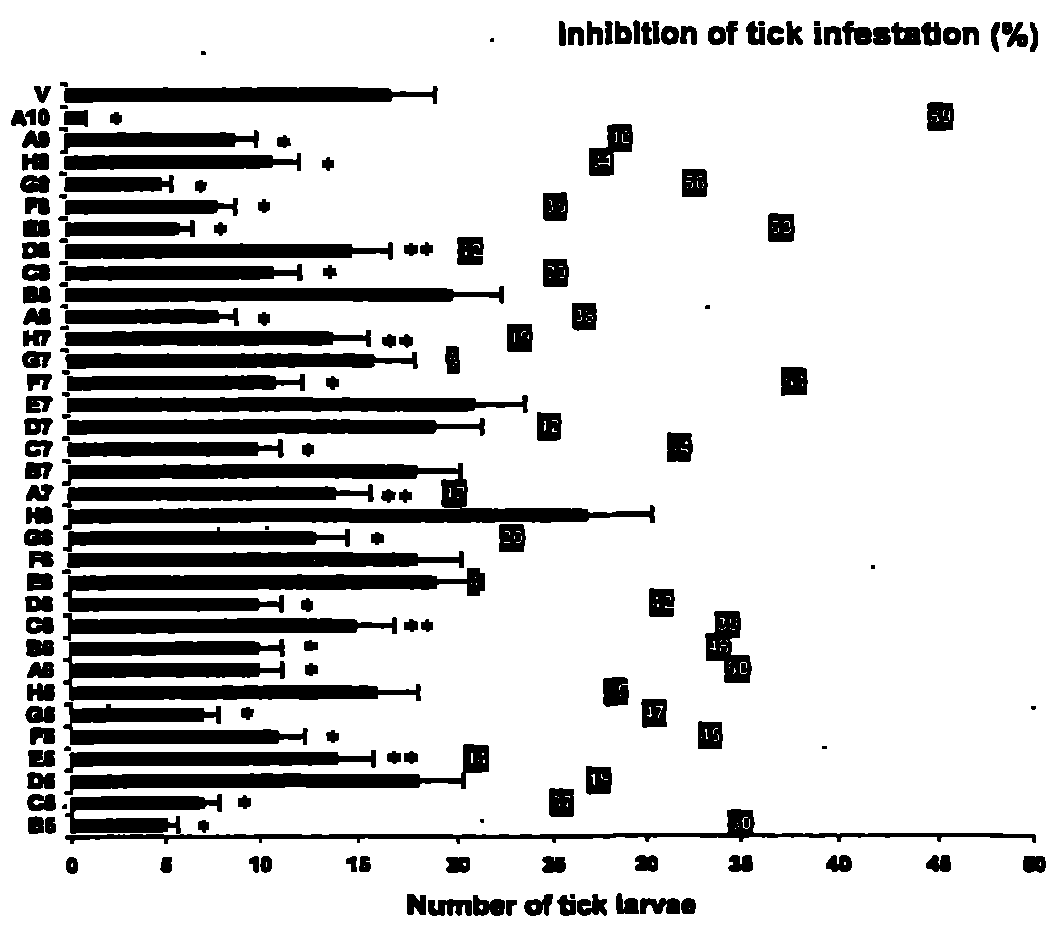
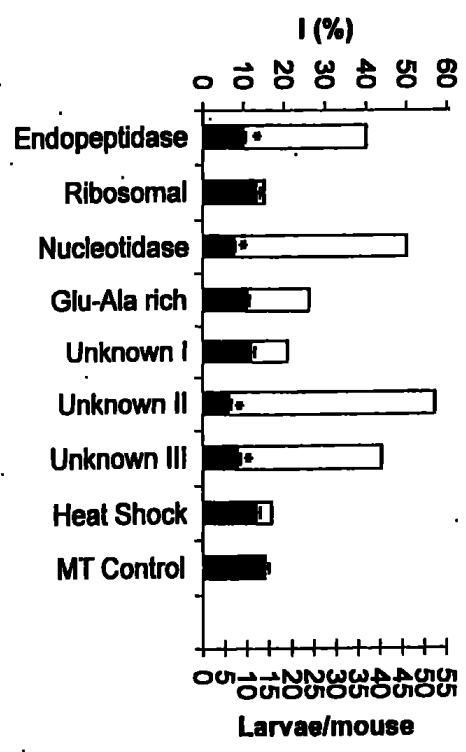


FIG. 2B

BEST AVAILABLE COPY

FIG. 3



BEST AVAILABLE COPY

22

81  
162

05-261 US.ST25.txt  
SEQUENCE LISTING

<110> De Le Fuente, Jose de Jesus  
Kocan, Katherine M.  
Garcia-Almazan, Consuelo  
Blouin, Edwin F.  
  
<120> Protective antigens and vaccines for the control of multi species tick  
infestations  
  
<130> 57338/05-261  
  
<150> US 10/972,789  
<151> 2004-10-25  
  
<150> US 10/425,563  
<151> 2003-04-29  
  
<150> US 60/376,251  
<151> 2002-04-29  
  
<160> 28

<170> PatentIn version 3.3

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

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

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

<400> 2

Met Glu Ile Ser Val Lys Pro Arg Pro Thr Lys Arg Lys Arg Lys Ala  
1 5 10 15

Ile Ile Ile Met Ala Arg Met Arg Thr Ala Phe Pro Thr Arg Ser Gly  
20 25 30

Asn Ser Phe Ser Arg Thr  
35

76  
163

05-261 US.ST25.txt

<210> 3  
<211> 2693  
<212> DNA  
<213> Ixodes scapularis

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

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

<400> 3  
ggtttgtgct gcttgga aaa tccaccagga gcctgcaacc gcaaaaaagt tcatcatccg 60  
gagctaagcc tatcgagga tggcttgcg c aacattaaag cgaacacacg attgggatcc 120  
gctgcatagt ccaaacggaa gatcgcccaa acgacggaga tgtatgcctt tgcgggtcac 180  
acaagcagcg actccccaa caagggcaca ccaaatcaac cttcaccct tcggtgaagt 240  
gccaccgaaa ttaacttcag aggagatagc ggccaacatt cgggaggaaa tgcgacgtct 300  
gcagcggcgc aagcagctct gcttctcgtc tccccctggag tcgggctccc cgtcggcgac 360  
tccccctgcg gccgattgcg gaccagcctc cccacgggc ctgtcccccg ggggcctgct 420  
gtcgcctgtg cgcagggacc aaccctctt caccttcgc caggtggggc tcatctgcga 480  
gcgcatgatg aaggagcgc agagccagat acgcgacgag tacgaccacg ttctgtctgc 540  
caagctggca gagcagtacg acacatttgt caagtttacg tacgaccaa ttcagaagcg 600  
gtttgagggg gccactcaa gctatttgtc ataacatgat gggcatctgc aaacaagcaa 660  
ggaactttga gggtttgtg taganggaag aaacccatgg tggggaagga cacaagacca 720  
acacttagac tcggcaagca agccagatcc tgtgggggtgc ggggacgggg ggaatgagtc 780  
cagtgggtgtc ttcggagttt ttttttttcc ttctccctt cctcgtctt ctttttgga 840  
caactcttta cggaactggt gtgcatccat tccccgaaag tgcaagagaa ggactcgcgg 900  
cggatcatct acggaggaag aagtgtgtat gcctttgtgc tttgggtctc ctttttttt 960  
tttttaaccg tcttgccatc tcgcataga agacctgtga tctagcaaac aaaggtgtgc 1020  
gaatgttatg caaaggttg aagtcagttt gaaagtgag cagagaaaaa tttgtatgc 1080  
tgagtatggt tagtcaccgt ttacttttca ggagggggat gactgaggaa cggagccgcc 1140  
ccaactctcg tttgtcttt attttttagga tactttctt gtggcgagaa tttgtgtgtg 1200  
catgcaagtt agcaggggta cgaggaaaag aagggttata aaatattctg ggtgagagct 1260  
gtagttcaac tgggggggtg gattgtaaag acctgcgggt accgagagga ccgcatgtc 1320  
tggctatatt acttgcattg agggggagga ggaatgctgg acctcgagca gagccagcaa 1380

42  
164

05-261 US.ST25.txt

gtatttttggga aaggaataaa aacaaaaatt ggcttagtgt acagatgtat aatatatatg 1440  
cactacaggg tgtgtgtgcc tcttgatatc tcccgtagct tgtgtccctc ttgcggcttg 1500  
cccatctgac aaccgcctgt gtacataggg caacgcaagt cttcagcatg gcaccctctt 1560  
ctttttcctt ttttttttct cataagtaat tttgaaggag agaataatctt gattttctaag 1620  
actcccaaaa catcaagtgc tctgggtgtc ggaattctac aagtgcgaaa gttcctttct 1680  
tttttttggt tgcagatagg aatggcttca ggttggtgtg cctatgcttt ggccacactt 1740  
tggaacacct gcaacagcga attaactggg gtaggcctgt gacacttgca cagccgtgtt 1800  
tttttttttt tttttttagt ttttgtagta ataaaaactt gttatggaaa gaggcgatta 1860  
tgctatggca ttgtctgtg ctatgcttat tggaatgcat gcctgatgtg tgttggtgctt 1920  
gaggatagtg aagtggatt gcaggggttg aaaggagctt anaatgcctt ctggcttttg 1980  
cataagcgtg gctttgggtg tctgtctgagc ttgtcaatca cagtgcaca tgactttgt 2040  
ccaattggtt tattggggac tgcttttggg tgcagagttt gactaatttt tagtaatgct 2100  
tcaaatgcaa cgcttctgtg ttgatcgag ttcataact cgtcgatcat tatgcatgtg 2160  
aaaaactgct cacgtaact gtatgttgat atcacagttg cactgaggaa gcctggctta 2220  
agatgggtgtg tgcaagtgtc tggcacactg cgtattttcc agcataaagc tggtagtgta 2280  
caggtgctgc tggtagtagc aaactttctg ccattgctgc cacaattcat gcatgaatga 2340  
gtgttgggga gtatgttagt ttatcttttc aaaactgatt tgaagtacca gtgtcctata 2400  
tttttgccat tgcattaata tggatcctgc attgtttacg gaaaaaagtg ataacattaa 2460  
ttatgaaaga tattaagcga gtttattgac tttccagga gaatttagac caggaggcac 2520  
tacatagcct gtggtctgct ttgttatgtt gacttggttt ttgtggaaat tagttctaaa 2580  
agttttacaat ctttttggca tgacttggtt gcattgccat tgtaatttgg ccattattag 2640  
aataaaggca ctctctcagt acctaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2693

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

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

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

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

44

165

05-261 US.ST25.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Thr Pro Ser Tyr Leu Ser  
180

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

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

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

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

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

85  
166

05-261 US.ST25.txt

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1762)..(1762)  
<223> n is a, c, g, or t

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

<400> 5  
atggcgctcgt gtggagcatc agcgacgggt cctctcgtcc taagagtaat ttccaacact 60  
gttaaaatag ttaacagcgc cggaaagata atcaaggaca tcatgaacag tggaaacctc 120  
ggaatcgtcg aaaaggaagg catcaatgac ctgcaaacgg aggcagacag atctgttcag 180  
cgctgcattg tgacttcgct ctcgagacag ttcccaaac tgacaataat tggatgaagag 240  
actctggagg agaaaaagat cagcgacgac tggatcatca ccgagcatga caaggatgtc 300  
ctggccactt ctctgccgga caacctgaag aacatcaaag aggaagattt ggtagtctgg 360  
gttgatcctc tggatggaac caaggagtac acacaggggt tcctggacca cgtgacgac 420  
ctgggtgggga ttgcggttga cggtaaggca gtgggtggag tgatccacca gccgtactac 480  
aactaccagg tggagaagga cgtctacaag cagggacgta ccatgtgggg cattgtcggc 540  
gtcgggtgcct ttgggatctc gcgcattgcg cctccggaga acaagaggat catcactacg 600  
acgcgctccc attccagccc caccatcaac agctgcattg aagccatgaa tccggacgag 660  
gtgctgcgag ttggaggtgc cgggcacaag gtgctgctgt tgattgaggg caaggctcac 720  
gcttacgtgt ttcccagcaa aggggtgcaag aaatgggaca cttgtgcccc cgaagcgatt 780  
cttcatgcca ctggcggcct tcttacagat gttcacggga acagattgga gtaccacaag 840  
gacgtggaac acgtcaatgc cggcggcggt cttgccacct gcctgaagga acaacacgaa 900  
tggttcaaga accacattcc cgaagatgtc cgcaagacgc ttctctatg agcaacctgc 960  
cgttgtccgt tgcgatcaca ctcaagtcgc gtttttctt taactttgtg gtgatgcggt 1020  
tcaaagtctt atactattag tgttttggtg gtccaaatat tattactaaa aaaacccgga 1080  
gacatgggac acaaaaaaat ggaggggagg gacaataagg tctcgaacac agctcgtaca 1140  
gaatttttta aaataatgtt gatttcagggt ttatttgggg aaactctgaa attaaccgtt 1200  
atgtcattat ttgggttgtg ccgtttgaaa ttttatgaaa tacgtaatag ctgcacgcat 1260  
tttgcaggcc actcagctcc ttgaatgctc gatgcttgat gcttctgcca acattatttg 1320  
tatctcaagt tttctacca caagaaacag taccctaaca ttttgaaata gtattactag 1380  
cttggatttt atctggtatg catatataag atctatggat gttcctaagg agggcatgaa 1440  
tttgaaacat accctgtcct taccaacctt caaacatttt tttttngcc tgcttaaaag 1500  
cattacatt gcttgatcgt tgaattaatt ttttagctga tgttaaggac acttataata 1560

86  
167

05-261 US.ST25.txt

attaaggaaa tgagatcgat cttgagcttg tttngcctc tgtaanaatt gatgctcttt 1620  
canacctaat gcttaatgca acaataatta tcaagtaatc cttactcagg tgtcagatat 1680  
gcaagcagat gccaatgctt ctgttcattg agtggcaaaa ggcattgctc tttgtcacat 1740  
tgcattgatt tatgacagcc cnccttaata aactataatg cagctaant gaaaaaaaaa 1800  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 1821

<210> 6  
<211> 316  
<212> PRT  
<213> Ixodes scapularis  
<400> 6

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

Ile Ser Asn Thr Val Lys Ile Val Asn Ser Ala Gly Lys Ile Ile Lys  
20 25 30

Asp Ile Met Asn Ser Gly Asn Leu Gly Ile Val Glu Lys Glu Gly Ile  
35 40 45

Asn Asp Leu Gln Thr Glu Ala Asp Arg Ser Val Gln Arg Cys Ile Val  
50 55 60

Thr Ser Leu Ser Arg Gln Phe Pro Lys Leu Thr Ile Ile Gly Glu Glu  
65 70 75 80

Thr Leu Glu Glu Lys Lys Ile Ser Asp Asp Trp Ile Ile Thr Glu His  
85 90 95

Asp Lys Asp Val Leu Ala Thr Ser Leu Pro Asp Asn Leu Lys Asn Ile  
100 105 110

Lys Glu Glu Asp Leu Val Val Trp Val Asp Pro Leu Asp Gly Thr Lys  
115 120 125

Glu Tyr Thr Gln Gly Phe Leu Asp His Val Thr Ile Leu Val Gly Ile  
130 135 140

Ala Val Asp Gly Lys Ala Val Gly Gly Val Ile His Gln Pro Tyr Tyr  
145 150 155 160

Asn Tyr Gln Val Glu Lys Asp Val Tyr Lys Gln Gly Arg Thr Met Trp  
165 170 175

82  
168

05-261 US.ST25.txt  
Gly Ile Val Gly Val Gly Ala Phe Gly Ile Ser Arg Ile Ala Pro Pro  
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 7  
gacctcaagg aaggcatctg cccgcaggcc ttctggctca acaaggagca gtgttgctgg 60  
gcctccaacg ataccttctt taagggggac gactgcaagc agtggtatcg gtggcccagag 120  
atgttcgaca gcggcatgga caaggacggg gcaggctttt acctgctctc ctacctgctg 180  
tacgtcatgt ggagtgtgct cttcgccacc ctggccgtca tgctcgttcg caccttcgcg 240  
ccctatgcct gtggatctgg aatccccgag atcaagacga ttctgagcgg cttcatcatc 300  
cgcggtacc tgggcaagtg gacgctgacc atcaaatacag tgtgtctggt gctggccgtc 360  
ggggcgggcc tcagcctggg caaagagggg cccctggtgc acgtggcctg ctgcatcggg 420  
aacatcttct cctacctctt cccaagtac ggcaagaatg aggccaagaa gagggagatc 480  
Page 7

88  
169

05-261 US.ST25.txt

ctgtcggctg ccgccgccgc gggagtttct gtggcctttg gggctcccat cggcgggtgtt 540  
ctcttcagcc tcgaagaggt gagctactac ttnccttga agacgctgtg gcgttccttc 600  
ttctgcgccc tgggtggcagc ctcgggtgctg cgctccatca acccctttgg caacgaccac 660  
ctggtgatgt tctacgtcga gtacgacttt ccctggc 697

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

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (191)..(191)  
<223> xaa can be any naturally occurring amino acid  
  
<400> 8

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

84  
120

05-261 US.ST25.txt  
Leu Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Val Ser Val Ala Phe Gly Ala Pro  
165 170 175  
Ile Gly Gly Val Leu Phe Ser Leu Glu Glu Val Ser Tyr Tyr Xaa Pro  
180 185 190  
Leu Lys Thr Leu Trp Arg Ser Phe Phe Cys Ala Leu Val Ala Ala Ser  
195 200 205  
Val Leu Arg Ser Ile Asn Pro Phe Gly Asn Asp His Leu Val Met Phe  
210 215 220  
Tyr Val Glu Tyr Asp Phe Pro Trp  
225 230

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

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

<400> 9  
gtttcttgtt acggtagtgg agtgctgagt ttactcgata atatctgaga aatagtggca 60  
atatcaattt ttctgtaaat tagaaatgta accaatggcg tggctatctt ctagtcgaca 120  
ctaacgtctc ggatctgctg ttcaaagtcc cgggcgatca agccgtattt gttgtccagc 180  
tgccaagtgc gtcgaatatg atgccgaaaa agaaagaatc agtcgcgagc tctaaagaag 240  
acgcgccgat cgacgtgacg ggcttgcctt cccacaaacg acacaagaag cacaagcaca 300  
aaaagcacaa gcgcaagcga ggcacggacc aagacgaaga ccaatcgccc gccgcgagcc 360  
cgagagcggg tggcgagggt agcagcagca agcccgcgct caagctcaag atcaagatcg 420  
gcggacagac ggtcgagaag aacgtgacca agctgaaaca gcagcgggccg ccgcccggg 480  
accctagcga agccgatctc gccgaactcc tgatgaaacc caactcgggc gatacgagcg 540  
cagacagcga tgacgaagag gaagcctggc tcgaagccct cgagtccggc aggctcgaag 600  
aggtcgacga cgagctccgc aaaatgaagg acccgaccct gatgacggcc aggcagcggg 660  
ccctgctcga gagcaagtcg cagaaggacg aggtcccggc gacggggatg gcnggcgtcc 720  
gcggagcccc tcaaagagat gtccgaggag atgattcagc ggcggatgct gcggggccaaa 780  
aagcggaagc agcaggccga agagaagaaa gagaaggaga agaagcagac gatcgagcgt 840  
ctgctcaaga agtccgactc gaggttgagg gccagcaaga agttggccaa gaagagcgat 900  
actcccaagg tgtcgtggtt caacacgcag gcaggcacgc tgctctcggt tcccgtcggc 960  
Page 9

17H

05-261 US.ST25.txt

gttgcgttcc cgctgtcggc agccgtggcc caggggtacc ccgagaagac gacgtgcggc 1020  
attaaggggt gtcgtaacc gaagaagtac tcgtgctcca agacaggcgt gcccctgtgc 1080  
agcctcgagt gctacaagac gaacatgctg cagatgtgcg tctgagcggg cagctaggct 1140  
tccgggctac agctgctcct tgtgtatatg tatataaagt cgagaatgct gaaaaaaaaa 1200  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 1221

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

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

At  
172

05-261 US.ST25.txt

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

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

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

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

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

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

Val Arg His  
275

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

<400> 11  
cgatgcaggc gatgacgggc ttgcggtgc agttcaacaa aaacagtttc gggctgactc 60  
cagctcagcc gctgcagttg cagattcccc tgcagcccaa ctcccagct gatgcgagct 120  
tgcagctggg aaccaacggt cccgtgcaga agatggaccc ctcaccaac cttcaggtgg 180  
ccatcaagaa caatgtggac gtgttctact tcagctgcct ggtgcccattg cacgtgctga 240  
gcacggagga cggcctgatg gacaagcggg tgttcctggc cacctggaaa gacatccccg 300  
cccaaaacga ggtccaptac accctcgaca acgtcaacct cactgcagac caagtttccc 360  
agaagctgca gaacaacaac attttcacga tagccaagag gaacgtggac ggccaggaca 420  
tgctgtacca gtccctgaag ctccaacag gcatttgggt gttggcggag ctcaagatac 480  
agccccggcaa tccaaggatc acgttgtctt tgaagacaag agcacctgaa gtggcagcag 540  
gtgtacaaca aacttacgaa ctcatctac acagctgagg ctgctgtgaa tgaaactctt 600  
ctcccccccc cttcttttga tggcagtcaa tgtctcgttt cattttcttg ttttcttttg 660  
cggcgtgcta cggaacaagg tcctacattc ccaagttata tgggtgtgtc gcgtaggggg 720  
cagagtgccg ctgagcccg cagagccttg tttctgagga gagccgaacg caccacttcg 780  
aaaaagaaaa agtgaaaacg gaaaaatgaa aaattttcca gttgcttcaa attaacattc 840  
ctcgtagtca gtctgtggcc gttgagtttg gtgtaaagaa gaaaaagggtg tctcttttag 900  
Page 11

af  
173

05-261 US.ST25.txt

tgaaaatggt tgctttttat tggatatccc tatcacaccg agcacgaaca taagaaatcc 960  
tgacaaggat tctcctttag ttgtattatg gtggctggag cacacgaggc acctgttgcc 1020  
aattcgaccc agcaaatgcc caattctcaa gatttgagtt cattgaggtt gttttgctcc 1080  
tcccccccca ccccccaact ttgtcgttgg attgtctaac agtgtaaata ggcgacgact 1140  
cgttattctt tttttcttca ttctttcttt ttgttgtcac gcgccccggg ggacgcgaca 1200  
caacttatgt gcataattga ttttcacagg ctgcgacgca gtctgtaaaa gaaggggaag 1260  
tgaaactctg ctccgccgct gctagtgtca tcacgggacg accatcgctt tttctctgac 1320  
tatttaaaca aaactgcata gcttaggggg cagtctgtgc aaagtggaac aaccaaactg 1380  
agccctgccc tttcgggtgtg tgtacaagca tctctgtgta acatgaacta ctttacatga 1440  
actacattgc atgaacggga gaagtttagt tgtttttttg tttttttttt caggtgacta 1500  
tgtcaacaga ttagaaccat tttttggaac ggctggaaag ataaccgctc attttgtttc 1560  
actaaaaga ctacgaaaag tgttgacttt ttgcatcggt ttggcaacgt ttgtttggca 1620  
tgcatttagt tgagcgtaat ggtatcacc ctcgtaaaca ataacagtgc aatggagcag 1680  
tactgtagt tccattaaag agcgagagtt tggtaaagg ttgttaattg aggtccgtgt 1740  
tatcctttga gtaggagagc ggcacttttt gcaaatagcg ctgctggggg cgtcatatct 1800  
gccctccaaa acatgcacat ttttaagtgtg aattgttgcg gcggcttgta caagtatgtg 1860  
tgttatgtgt agaaaaagaa ctcttaatta aaatatttgt ggccaaaacg tcaaaaaaaaa 1920  
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1942

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

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

93

174

05-261 US.ST25.txt

Thr Glu Asp Gly Leu Met Asp Lys Arg Val Phe Leu Ala Thr Trp Lys  
85 90 95  
Asp Ile Pro Ala Gln Asn Glu Val Gln Tyr Thr Leu Asp Asn Val Asn  
100 105 110  
Leu Thr Ala Asp Gln Val Ser Gln Lys Leu Gln Asn Asn Ile Phe  
115 120 125  
Thr Ile Ala Lys Arg Asn Val Asp Gly Gln Asp Met Leu Tyr Gln Ser  
130 135 140  
Leu Lys Leu Thr Asn Gly Ile Trp Val Leu Ala Glu Leu Lys Ile Gln  
145 150 155 160  
Pro Gly Asn Pro Arg Ile Thr Leu Ser Leu Lys Thr Arg Ala Pro Glu  
165 170 175  
Val Ala Ala Gly Val Gln Gln Thr Tyr Glu Leu Ile Leu His Ser  
180 185 190

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

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

<400> 13  
cgcgccgtgc agaagctgcg tcgggagggtt gagaaggcaa agaggaccct gtccactgct 60  
caccaggcca ggatcgagat tgaatcggtt ttcgagggag aggacttcag tgagaccctg 120  
actcgtgcta agtttgagga gctgaacatg gaccttttcc gttccaccat gaagcctggt 180  
cagaaggtag tcgaggatgg tgacctcaag aagactgatg tggacgagat tgtgcttgtc 240  
ggagggtcca ccaggatccc caagggtcaa cagctggtca aggagttcct caatggcaag 300  
gaaccacccc gtggcatcaa ccccgacgaa gcagtcgcct acggtgccgc cgtgcaggct 360  
ggagtcctcg gcggagagga agacactggg gacctcgtgc tggtggacgt gaaccctctg 420  
accctcggca tcgagacagt gggaggcgtc atgacgaaac tgatcccccg taacacagtc 480  
atccccacga agaagtctca gatcttctcc acggcctcgg acgagcagag cactgtcacc 540  
atccagggtc ttgaggggga gcgtcccctg acaaaggaca accaccagct gggcaagttc 600  
gacctgactg gcatcccacc tgctcctcga ggtgtgcccc aaatcgaggt gaccttcgag 660

4A  
175

05-261 US.ST25.txt

attgacgtca acggtatcct gcgggtcagt gcagaggaca ngggtacagg caacaagcag 720  
aagatcacca tcaacaatga ccagaacagg ctgacgcctg aggacatcga gaggatggta 780  
aaggacgccg aaaagtttgc cgacgaggac aagaagggtca aggagaaggt ggaggccccgc 840  
aacgaactgg agtcttatgc ctactccctc aagaaccaga ttggagacaa ggagaagatg 900  
ggaggcaagc tctccgacga ggacaagaag actattgagc aagctgtgga cgagaaaatc 960  
aatggctgg agcagcacag tgacgctgat gcggaagaac tcaaggaaca gaagaaacag 1020  
ctggctgata ctgtgcagcc gattgtagcc aagctgtacc ctgcaggagg caccaccgcg 1080  
ccgacggaca aagatgactc tacaaaggac gagttgtaaa aacaaggcca gatctcttgg 1140  
gtacagcgaa aggcattgggg cagcagcatt atcacaagtc atctgttacg atcatgagct 1200  
catcatttca ccacctctac agtgctgctg ctgcctgcct ttgggctggg tgagtgttct 1260  
tggacctatt taccatgac attctctgta caaaaacaat tctttctgtg tttttttttt 1320  
ttcgttgta gtaacttaag ttatacagat gtcttctact ggggtgggctt tctccatgag 1380  
tgggaggggg ctgggtgtca aataaaagtg tttctattaa aaaaaaaa 1428

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

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

<400> 14

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

af

176

05-261 US.ST25.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Lys Gln Leu Ala Asp Thr Val Gln Pro Ile Val Ala Lys Leu  
Page 15

af  
177

340 05-261 US.ST25.txt 350  
345

Tyr Pro Ala Gly Gly Thr Pro Pro Pro Thr Asp Lys Asp Asp Ser Thr  
355 360 365

Lys Asp Glu Leu  
370

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

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

<400> 15  
cgacgtgttt gtgagtgcag cgggtgaactg gacgggtgtcg tggccacgcg atggcagcgg 60  
cgggtgatgaa ctgcctacgg actgcgcttt taggcgctct cgtcgtccaa ctctacgcca 120  
cgcagatagg tcaccggaaa ttcgagtaca agtacagttt caagggaccc tacctggcgc 180  
agaaggatgg atcgggtgcct ttctgggagt acggcgggcaa ttgcatcgcc agtgaggaga 240  
tggttcggat cagccctcc ctgaagagca agaaaggatc catctggtcc aagctgccga 300  
catcgttccc ttggtgggag gtggagctgg tgttccgcac cacgggtacg ggcaggatag 360  
gagctgacgg cctggccttc tggtagacag acaagaagca ggcggagggt cctgtctttg 420  
gaagcagcga caagtggact ggcctggcca tcttcttcga ttccttcgac aatgataaca 480  
agcacaacaa cccatacatc atgggcatgg tgaacgatgg aacaaaagcc tacgatcatg 540  
agagtgcagg tgccaaccaa cagctagcgg gatgccagcg ggacttccgc aacaagcctt 600  
accctgtcag ggccaagata gaatacttca acaacattct cacgggtgctg ttccacaacg 660  
gcaacaccaa caacgacggg gactacgaga tgtgcttccg tgcggagaac gtgttcctgc 720  
cgaccaacgg ccactttggg gtgtccgccg ccacgggggg cctggcagac gaccacgacg 780  
ccctcaagtt cctgacgacg agcctgcatg cggagggcac gcagccggcc ctggcccagg 840  
gtatggccga ctgagagaag gagaagttct ccaaggagta tgaagtatac aaggacaagc 900  
tggaaaagca gaaggaggag taccggaaga cgcacccgga ggaggccgct aagcaggcca 960  
tggagcacgg ccccgagcag gcctacgaca cgcagcagca gcgcgagctg cgccagatct 1020  
tcgagggcca gagccacaaa ttgtttgagg ggctcaaggc actgcaccgc aagctggacg 1080  
aggtgctcgg gcgccaggag cgcaccctgt cgctgggtgtc ggctggcggc gccggcgtgg 1140  
ccgtgggagg tgttccgcca ccgcagatgg gtggagtgcc gtcgctgcag aggcacgaag 1200

47  
178

05-261 US.ST25.txt

cagagtcctt gctgagcagc cagcgggagc tgctgcagac ggtggctcag gtcaagagct 1260  
ttgtggccga ggtgcatcaa cgcacggcca ccctgcaaca ccagggggcg ggaggcacc 1320  
agggcctcac ggccgagcag ctgcaagtgc tccaccaggt gcgggacagc gtggccagca 1380  
tgcaccggga cgtctccaac aaccagccgc agaggactgg ctgcgcgaca tcctgtctca 1440  
gcactacca cttcttctgtg tttgcaacgt tgcagttggc tgtcacgctg ggctacttgg 1500  
tgtacaggag cagcaaagag gcggcgcca agaagttcta ctgagtgcag atctcgagcc 1560  
ttgccttgcc ctccccctcc atggagtggc ccttaacccc acagactgcc agaaaccagt 1620  
gttgccagag gagccccct cccttcttat tgggtggggc gccacagcca tcacccattc 1680  
ttcgagacaa ggccactgtt tggggggagg ggcaagagat tcatccgggg tgcgcaacaa 1740  
aacatggccg tacagagga ggggtgctcc agaactgggt cccagccaca tcgttgctg 1800  
ggagcgcctt tctnctcac tctaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa 1847

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

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Thr Gly Leu Ala Ile Phe Phe Asp Ser Phe Asp Asn Asp Asn Lys  
Page 17

179

05-261 US.ST25.txt  
140

130

135

His Asn Asn Pro Tyr Ile Met Gly Met Val Asn Asp Gly Thr Lys Ala  
145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

47  
180

05-261 US.ST25.txt

Glu Ser Leu Leu Ser Ser Gln Arg Glu Leu Leu Gln Thr Val Ala Gln  
385 390 395 400  
Val Lys Ser Phe Val Ala Glu Val His Gln Arg Thr Ala Thr Leu Gln  
405 410 415  
His Gln Gly Ala Gly Gly Thr Gln Gly Leu Thr Ala Glu Gln Leu Gln  
420 425 430  
Val Leu His Gln Val Arg Asp Ser Val Ala Ser Met His Arg Asp Val  
435 440 445  
Ser Asn Asn Gln Pro Gln Arg Thr Gly Cys Ala Thr Ser Cys Leu Ser  
450 455 460  
Thr Thr His Phe Leu Leu Phe Ala Thr Leu Gln Leu Ala Val Thr Leu  
465 470 475 480  
Gly Tyr Leu Val Tyr Arg Ser Ser Lys Glu Ala Ala Ala Lys Lys Phe  
485 490 495

Tyr

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

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

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

<400> 17  
catcactagt agcgagacac gtgcgtaaaa atggggccca aaacgctgtc taagcagccc 60  
gctaaagctt cttcatccac ttccaagcgc accgccggcc ccacaataag caagcagacg 120  
gaggacagcg atgacgaagg gtcaagcagc gcctactccg acttggagga ctccgaagga 180  
gccgacagca gcgactcgaa cgatttgtcg gacacggagg cgtcggagga tgactacgat 240  
gactcccaag acgaagaaaa cacgaagatt actttgactg ggggtggagg gaaggacctt 300  
gagttgaggg ggaaggacca ggaggaccg gtggagtctg gcaaaagggtc ggcattggcac 360  
cggcagcaag aggacgcca ggaggacaga cgaacgcaag tgggtggaaga tgaatatgcc 420

100  
181

05-261 US.ST25.txt

tttgactctt ccgacgaaga ggacgttcgc aacacggttg gcaacattcc tctggagtgg 480  
tacgagcact atccgcacat cggttatgat ctggaaggca agccaatcct gaagccgcct 540  
cgggttagtg acctggacga cttcctgagg aaaatggatg accccaacta ttggaggacg 600  
gtgaaggaca agagcacggg acaggacgtt gtcctgaccg acgaagatgt ggacctgatt 660  
cagaggctgc agaaaggaca gttccccagc tcgacgactg acccttacga gccatttgag 720  
gacatctttt cgcacgagac catgatccac ccggtgacca ggcaccctcc ccagaaacgc 780  
agcttcgtgc cttcaaggat agaaaaagca atggtgtcaa agatggtgca cgcaatcaag 840  
atgggctgga tcaagccccg agtaaagaag catgaccag aaagattcag cctcctgtgg 900  
gacaaggatg actcgacagc gggcagcaat gagcgaatgc agcgccacat cccggcacc 960  
aagatgaagc tgccgggtca tgaggagtct tacaaccgc cggccgaata cctcttcacc 1020  
gaggaagagg aggccaaagt gagagagcag gagcccgaag aacggcgcat aaacttcctg 1080  
cccgccaagt acccatgtct gcgcgcagtc ccagcctacg aacgcttcat tgaggagagg 1140  
tttgagcgt gtctggatct ctacttgctc ccgaggcagc ggaagatgag ggtgaatgtg 1200  
gatgcagagg acctgattcc tcagctgccc aaaccgaagg acctgcagcc tttccaagc 1260  
attcagtcta ttgtctatga gggtcatacg gactgtgtcc tctgcctgtc tttggagcct 1320  
gcgggacagt tctttgcatc anggtccgag gacggcaccg ttcgcatttg ggagctcttg 1380  
acgggcangt gcctcaagaa gttccagttc gaggcgcccg tgaagagcgt ggcctggtgt 1440  
ccagtgtctg tttccatgaa actctgcgtg gacaagactg tttccatgct ggatgccgga 1500  
gttacggaca aactgctgcc gttcaccagc ggacaccgag ttgtctgccc tccccgaaga 1560  
gtcctcgggc caggcggcgg tagtggagtg ggagcagacg tcggcctcct ctccagagtt 1620  
cctctcccgg ggggagcgtc tgcgggtcgt tcaccgccac ggtgtggtgc aggtgacgtg 1680  
gcactcgagg ggagactact ttgccactgt cacggacgag ggacaggcca ccgtgcttgt 1740  
ccatcagttg tccacgcggc ggttcgcagg ctccccttca gcaaggcgaa gggcgggggtg 1800  
tcccgggtgc tgttcacccc gctgcgcccc ttctgtctgg tggcgtgcca gcgcacagtg 1860  
cgggtctacc acctgctcaa gcaggagctg gccaagaggc tcacatcaa ttgcaagtgg 1920  
atctcgtgca tgggccgtcc acccccaggt gacaatctgc tgatcggcac gtacgagaag 1980  
cggctgatgt ggttcgatct ggacctctcg accaaaccgt accagcagct gcgcatacac 2040  
aatgccgcca tccgcagtgt ggcgttccat ccgcgtatc cactgtttgc gtccgccggc 2100  
gacgatcgca gcgtgatcgt ttcgcacggg atggtgtaca atgatttact gcaaaaccca 2160  
ctgatcgtgc cactgagacg gctgaagaac catgccatca gcaagggatg ggggtgtgtg 2220  
gactgcgcct tccatcccca ccagccgtgg atagtcacgg ccggagcaga cagcacgctg 2280  
cggctcttca cctaagccgg gacgtcgtct ggtgtacata gtgaatcgtc aagaccgtgc 2340

not  
182

05-261 US.ST25.txt

caataaaagg actccacacc taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2400  
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2460  
aaaaaaaaaa aaaaaa 2475

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

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (438)..(438)  
<223> xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (453)..(453)  
<223> xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Ile Pro Leu Glu Trp Tyr Glu His Tyr Pro His Ile Gly Tyr Asp  
Page 21

102  
183

05-261 US.ST25.txt  
155

145 150 160

Leu Glu Gly Lys Pro Ile Leu Lys Pro Pro Arg Val Ser Asp Leu Asp  
165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

184

184

05-261 US.ST25.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

185

05-261 US.ST25.txt

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

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

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

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

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

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

Phe Thr

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

<400> 19  
caaagatgct gctgttctgc ccgacgtgcg ccaacatcct cattgtggaa caaggcttgg 60  
agtgccttccg tttcgccctgc aacacatgcc cctacgtgca caacatcaag gcgaagatgt 120  
cgaatcggaa gtacccgcgg ctcaaggacg tggacgacgt gctcggcggt gcagccgcct 180  
gggagaatgt tgactcgacc gaagagaagt gcccgaagtg tggccatgag cgggcctatt 240  
ttatgcagat ccagactagg tcggccgacg agcccatgac cacccttctac aagtgtgtgca 300  
accagctctg tggccaccag tggaggggact gacagatggc ggctttgacg aactcatgcc 360  
cgtgcaaaat gcgtcggggg gagagagttt tggaataaaa catgcgccctt actttcataa 420  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 447

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

<400> 20

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

7195  
186

05-261 US.ST25.txt

Gly Leu Glu Cys Phe Arg Phe Ala Cys Asn Thr Cys Pro Tyr Val His  
20 25 30  
Asn Ile Lys Ala Lys Met Ser Asn Arg Lys Tyr Pro Arg Leu Lys Asp  
35 40 45  
Val Asp Asp Val Leu Gly Gly Ala Ala Ala Trp Glu Asn Val Asp Ser  
50 55 60  
Thr Glu Glu Lys Cys Pro Lys Cys Gly His Glu Arg Ala Tyr Phe Met  
65 70 75 80  
Gln Ile Gln Thr Arg Ser Ala Asp Glu Pro Met Thr Thr Phe Tyr Lys  
85 90 95  
Cys Cys Asn Gln Leu Cys Gly His Gln Trp Arg Asp  
100 105

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

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

<400> 21  
ccccccaggc gcagggcttc gttcaggtcg accagggggc cctccccgca agccccgagg 60  
agcgccacct ggcaagcatg caggtcaatg gatatgagaa cccacctac aagtacttcg 120  
aggccaacac caactgagcg gccacgcccc caggggaggg ggaaaagggg gcggacggac 180  
gtattgtgcc tgctgcgggc tgcgggatta gctcgtcccg cgttgttccg ggagccagtt 240  
ggtttgctc gcgtcttagg agtaggcacg gcctcccttc tgcacccggt caaggaccat 300  
ggttgttggg gacacgagcg gcgtggggcg cagccagcct gagctttggg tcccgggtacc 360  
acggcaaacc gtttgttccc acccgcgga tgaaaatttt gtttgctca gtttctttcg 420  
aatcgagcgt cggcgccgcc tccgacagcc cggagtgcac tctgtctgtt gcgaaagacc 480  
aatggagtag ttgacactcg ggtcgcagct cgaacaagct cccgtaaaac gctacttaac 540  
cggggccggc gaccgagcgt agagcttgct gtgcgtagtt gtggataaaa cttttttttt 600  
ttgtgtgtgt gcttggtcac agacaatggg cagcttccga cgtagccac gcgccacacg 660  
ctcgcctttg ttttcttctt ctgcgggttg tcatacttag tttccattgg cgggtaaca 720  
ttccagtcg ggcgggcgcc cccgttcagg cgcgtcctga tcaaaattga gcatttggtt 780  
gtgcngtgca tttattggcc gcagcagggg gttcccgggt gcacctggtg tcgtgacacg 840

187

05-261 US.ST25.txt

catgtcgtga ctttcccctc agacggttgt ccttgctcat ggctcgttca cacctctagt 900  
gctggtagtc tctgttgctt aggtttgtag gagcacacta cagcagaggg tgtcacaag 960  
ttttctaagc tgtatataca tgaggaaaac attgcgttgc acacacgcga gtttcggcct 1020  
gttttttagtt gggacagtga acgttttttg tacaggttat tatgtagtgc ctacatttgt 1080  
atgtgccagc tgcattgtgt ttcttgcatt tggggaagcc tccgtgctgc cccgagctgt 1140  
gtgcggcccc tcctgagttt ccatgtgccg tgtgcccagc ctagggtgaa ctgggggtgc 1200  
agatgccctt gcgcacgggtg tgccccggcg agcattgtgt gtccgtaggc catcgacgt 1260  
attcatgcga aattaatgtg gtcacagctg tcattgtctc agtgaacata tcatatgtcc 1320  
aaatttgtct cccctgtcag tgtgtgcttc tcttggttct acacttgcct gcatttttgt 1380  
tagtttgccg gactgtcctt ttcgggtccca ggtcgacagc aggctataac aacaattccg 1440  
gtattttcca gtatcgggtc acaccagggtg taacctattg tgcattgtgt gtaacttgag 1500  
ggaaaagct aaaataaaaa tttgcaagag tctcactaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1560  
aaaaaaaa 1567

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

<400> 22  
Pro Gln Ala Gln Gly Phe Val Gln Val Asp Gln Gly Ala Leu Pro Ala  
1 5 10 15  
Ser Pro Glu Glu Arg His Leu Ala Ser Met Gln Val Asn Gly Tyr Glu  
20 25 30  
Asn Pro Thr Tyr Lys Tyr Phe Glu Ala Asn Thr Asn  
35 40

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

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (534)..(534)  
<223> n is a, c, g, or t  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (598)..(598)  
<223> n is a, c, g, or t

138

05-261 US.ST25.txt

<400> 23  
tgagaagaca ctagaggaca agttcttcga gcatgagggtg atgctgaatg tgaatgcgtt 60  
catgcagcag ttccattccg gcgtttttta tgcctacgtg aagctgaagg aacaagagtg 120  
ccgcaacatt gtctggattg ccgaatgcgt tgctcagcgt catcgggtcca agatcgataa 180  
ctacattcca atcttctagt cgctcgagga aaagaaatgg gccaatcgg tagtttgtcg 240  
gtgtaatata tatatatata tatatctact tcgcaaaatt cttcagctag agtgtctatg 300  
tctgggttagc tgcgattgtg cgagagggga aaaaaatgta gtcagtggca tgatcaagga 360  
aggaaaaaaa ttggccaata acttttacct tttgaagtta aagcaagggt taaaataatg 420  
tctattttta cttcgcttta ccgtgtgctg gctattgctt tgcaaacgtt ttttaaaatt 480  
tttgcagttc gtctttcttc ttttgagcac atatttattc cagagttcca atancctttt 540  
atgtgtgaat gaatgactaa tccatgttgg ggttggttaa tgggtgcattg ttgaaaanat 600  
aaaccccaac tccagctggc ctttggaana aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 704

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

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (432)..(432)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (467)..(467)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (472)..(472)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (481)..(481)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (493)..(493)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (495)..(495)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>

189

05-261 US.ST25.txt

<221> misc\_feature  
<222> (499)..(499)  
<223> n is a, c, g, or t

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

409  
195

05-261 US.ST25.txt

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (593)..(593)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (599)..(599)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (603)..(603)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (606)..(606)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (611)..(611)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (619)..(619)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (623)..(623)  
<223> n is a, c, g, or t

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

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

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (651)..(651)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (658)..(658)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (666)..(666)  
<223> n is a, c, g, or t

<220>  
<221> misc\_feature

191

05-261 US.ST25.txt

<222> (673)..(674)

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

<400> 24

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

<210> 25

<211> 720

<212> DNA

<213> Ixodes scapularis

<220>

<221> misc\_feature

<222> (488)..(488)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (625)..(625)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (627)..(627)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (631)..(631)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (641)..(641)

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

<220>

<221> misc\_feature

<222> (680)..(680)

192

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

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (692)..(692)  
<223> n is a, c, g, or t

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

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

<400> 25  
ctctcagcga ctccgacgtc caaaagcaga tcaagcacat gatggctttc atcgaccagg 60  
aagccaacga aaaggcagaa gaagtagacg ccaaggcagg aagaagagtt caacatcgag 120  
aagggccgcc tggtcacgga gcaaaggctc aagatcatcg actactacac ccgtcgagag 180  
aagcaagttg aactgcagcg caagatccaa agctccaaca tgctgaacca ggcccggctg 240  
aaggtgctga aggcggggcga ggaccacatt gcgacgggtgc tggaggaggc caagcgccgc 300  
ctgggggaca tcaccagggga ccaggctcgc taccaagccc tcctgcagag catggttctg 360  
caggcactgc ttcagctcct cgagcaggag gtggtcgtcc actgccgacc gcaagacgcc 420  
gggctgctga acttgacac gctgagtgcc aagttcaagg aggccactgg ccgagaggtc 480  
aagctcantg tggagccag cctggcttcg agcagctgcg gcggagtcga gatgctctcc 540  
aggcggggca agattcggt ctgcaacacg ctcgagtcgc ggctggacat gattgccctt 600  
cagctttctg ccgcagatca agacngncct nttcggcagg naccccaac cgcaagttca 660  
tggactaggc gggctattgn ccccgccatt cnggccagtn agcttggacc gtgtttacng 720

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

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

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

112

193

05-261 US.ST25.txt

<400> 27

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

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

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

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

Ala Asn Ile Arg Glu Glu  
65 70

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

<400> 28  
atggccttgcg caacattaaa gcgaacgcac gactgggata ccctgcacag tccgaacgga 60  
agatcaccaa agcggcggaag atgtatgcct ttttcagtca acccaccagc tcctccaaca 120  
agggcgacacc aaatcaatcc ctgcctttc ggcgacgtgc caccaaagct gacttcagag 180  
gagatagcag ccaacatccg tgaggaaatg cggcggtgc agcggcgcaa gcagctctgc 240  
ttccagggtg cagagtgcag tagcccccc gaaggctgtt cccccattgg ctccccctcc 300  
cagcacaccg gcggcctcct gtcacctgtg cgccgagacc agccccctgtt caccttccgc 360  
caagtgggac tcattctgtga gcgcatgatg aaagagcgag agagccagat acgagaggag 420  
tatgaccacg tgctctccac caagcttgca gagcagtacg acacatttgt caagtttacg 480  
tagacacaaa 490

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

<400> 29

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

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

Val Asn Pro Pro Ala Pro Pro Thr Arg Ala His Gln Ile Asn Pro Ser  
Page 32

113  
194

35

40

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

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

Phe Gln Gly Ala Glu Cys Ser Ser Pro Pro Glu Gly Cys Ser Pro Ile  
85 90 95

Gly Ser Pro Ser Gln His Thr Gly Gly Leu Leu Ser Pro Val Arg Arg  
100 105 110

Asp Gln Pro Leu Phe Thr Phe Arg Gln Val Gly Leu Ile Cys Glu Arg  
115 120 125

et Met Lys Glu Arg Glu Ser Gln Ile Arg Glu Glu Tyr Asp His Val  
130 135 140

Leu Ser Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Thr Phe Val Lys Phe Thr  
145 150 155 160

Tyr Asp Gln

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

<400> 30  
atggcttgcg caacattaaa gcgaacacat gactgggacc ccttgcacag tccgagtggc 60  
agatcgccga agcgacgccg atgtatgcct ctgtccccgc ctctacaag ggcgcaccag 120  
atcgatccct cgccttcgg agacgtgccca ccaaagttga cticagagga gatagcagcc 180  
aacatccgtg aggagatgcg acggctacaa cggcgcaagc agctctgttt ccagggcgct 240  
gaccctgaat cccagcatac cagtgggtctc tcgtcaccag tgcacgaga ccagcccctg 300  
ttcacgttcc gccaggttgg gtcatttgc gaacgaatga tgaaggagcg agagagcaag 360  
atacgggagg agtatgacca tgtgctatct accaaactcg cagaacagta cgacacattt 420  
gtcaagttta cgtacgacca aa 442

<210> 31  
<211> 147  
<212> PRT  
<213> Boophilus microplus  
<400> 31

TT\*

195

05-261 US.ST25.txt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Asp Gln  
145

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

● <220>  
<223> oligonucleotide primer

<400> 32  
gcgtcgtgtg gagcatcagc gac

23

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

<220>  
<223> oligonucleotide primer

<400> 33  
tcgcaacgga caacggcagg ttg

23

12

196

05-261 US.ST25.txt

<210> 34  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleotide primer

<400> 34  
gcttgcgcaa cattaaagcg aac 23

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

<220>  
<223> oligonucleotide primer

<400> 35  
cgcttggttg cagatgcccc tca 23

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

<220>  
<223> oligonucleotide primer

<400> 36  
gaaatatctg tgaaaccaag gcc 23

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

<220>  
<223> oligonucleotide primer

<400> 37  
attgcacaac acatcattaa ctg 23

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

<400> 38  
atggccttggtg cgacattaaa gcggacacat gactgggacc ccttgcacag tccgagtggc 60  
agatcaccaa agcgacgccg atgcatgcct ctgtccccgc ctccaacgag ggcgcaccag 120  
atcgatccct cgcccttcgg agacgtgcca ccaaagttga cttcagagga gatagcagcc 180  
aacatccgcg aggagatgcg acggctacaa cggcgcaagc agctctgttt tcaaggcacc 240

Page 35

✓  
197

05-261 US.ST25.txt

gacgccgaat cccagcatac cagtggctct tcgtcaccgg tgcgtcgaga ccagccccctg 300  
ttcacgttcc gccaggttgg gctcatttgc gaacgcatga tgaaggagcg agagagcaag 360  
atacgggagg agtatgacca cgtgctatcc accaagctcg cagaacagta cgacacgttt 420  
gttaaattta cctacgacca aattcagaag cggtttgagg gtgctacgcc cagctatttg 480  
tcgtaa 486

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

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser

<210> 40

177

198

05-261 US.ST25.txt

<211> 555  
<212> DNA  
<213> Ixodes scapularis

<400> 40  
atggcttgcg caacattaaa gcgaacacac gattgggacg cgctgcatag tccaaacgga 60  
agatcgccca aacgacggag atgtatgcct ttgtcgggtca cacaagcagc gactccccc 120  
acaagggcac accaaatcaa cccttcaccc ttcgggtgaag tgccaccgaa attaacttca 180  
gaggagatag cggccaacat tcgggaggaa atgcgacgtc tgcagcggcg caagcagctc 240  
tgcttctcgt ctccccctgga gtccgggtcc ccgtcggcga ctccccctgc ggccgattgc 300  
ggaccagcct ccccccacggg cctgtccccc gggggcctgc tgtcgcccgt gcgcagggac 360  
caacccctct tcaccttccg ccaggtgggg ctcattctgcg agcgcatgat gaaggagcgc 420  
gagagccaga tacgcgacga gtacgaccac gttctgtctg ccaagctggc agagcagtac 480  
gacacatttg tcaagtttac gtacgaccaa attcagaagc ggtttgaggg tgccactcca 540  
gctatttgt cataa 555

<210> 41  
<211> 555  
<212> DNA  
<213> Ixodes ricinus

<400> 41  
atggcttgcg caacattaaa gcgaacacac gattgggacg cgctgcatag tccaaacggt 60  
agatcgccca aacgacggag atgtatgcct ttgtcgggtca cacaagcagc gactccccc 120  
acaagggcac accaaatcaa cccttcaccc ttcgggtgaag tgccaccgaa attaacttca 180  
gaggagatag cagccaacat tcgggaggaa atgcgacgtc tgcagcggcg caagcagctc 240  
tgcttctcgt ctccccctgga gtccgggtcc ccatcgggtga ctccccctgc ggccgagtgt 300  
gggcccagcct ccccccacggg cctgtccccc gggggcctgc tgtcgcccgt gcgcagggac 360  
cagccccctct tcaccttccg ccaggtgggg ctcattctgcg agcgcatgat gaaggagcgc 420  
gagagccaga tacgcgacga gtacgaccac gtgctctctg ccaagctggc agagcagtac 480  
gacacattcg tcaaatttac gtacgaccaa attcagaagc ggtttgaggg tgccactcca 540  
agctatttgt cataa 555

<210> 42  
<211> 442  
<212> DNA  
<213> Boophilus microplus Cepich

<400> 42  
atggcttgcg caacattaaa gcgaacacat gactgggacc ccttgccacag tccgagtggc 60  
agatcgccga agcgacgccc atgtatgcct ctgtcccccgc ctectacaag ggccgaccag 120

TC5  
199

05-261 US.ST25.txt

atcgatccct cgcccttcgg agacgtgcc acaaagttga cttcagagga gatagcagcc 180  
aacatccgtg aggagatgcg acggctacaa cggcgcaagc agctctgttt ccagggagct 240  
gaccctgaat cccagcatac cagtgggtctc tcgtcaccag tgcacgcaga ccagccccctg 300  
ttcacgttcc gccagggttg gctcatttgc gaacgaatga tgaaggagcg agagagcaag 360  
atacgggagg agtatgacca tgtgctatct accaaactcg cagaacagta cgacacattt 420  
gtcaagttta cgtacgacca aa 442

<210> 43  
<211> 442  
<212> DNA  
<213> Boophilus microplus Muñoz

<400> 43  
atggcttgcg caacattaaa gcgaacacat gactgggacc ccttgcacag tccgagtggc 60  
agatcgccga agcgacgccg ctgtatgcct ctgtccccgc ctctacaag ggcgcaccag 120  
atcgatccct cgcccttcgg agacgtgcc acaaagttga cttcagagga gatagcagcc 180  
aacatccgtg aggagatgcg acggctacaa cggcgcaagc agctctgttt ccagggcgct 240  
gaccctgaat cccagcatac cagtgggtctc tcgtcaccag tgcacgcaga ccagccccctg 300  
ttcacgttcc gccagggttg gctcatttgc gaacgaatga tgaaggagcg agagagcaag 360  
atacgggagg agtatgacca tgtgctatct accaaactcg cagaacagta cgacacattt 420  
gtcaagttta cgtacgacca aa 442

<210> 44  
<211> 442  
<212> DNA  
<213> Boophilus microplus S. Lucía

<400> 44  
atggcttgcg caacattaaa gcgaacacat gactgggacc ccttgcacag tccgagtggc 60  
agatcgccga agcgacgccg atgtatgcct ctgtccccgc ctctacaag ggcgcaccag 120  
atcgatccct cgcccttcgg agacgtgcc acaaagttga cttcagagga gatagcagcc 180  
aacatccgtg aggagatgcg acggctacaa cggcgcaagc agctctgttt ccagggcgct 240  
gaccctgaat cccagcatac cagtgggtctc tcgtcaccag tgcacgcaga ccagccccctg 300  
ttcacgttcc gccagggttg gctcatttgc gaacgaatga tgaaggagcg agagagcaag 360  
atacgggagg agtatgacca tgtgctatct accaaactcg cagaacagta cgacacattt 420  
gtcaagttta cgtacgacca aa 442

<210> 45  
<211> 442  
<212> DNA  
<213> Boophilus microplus Susceptible

404  
200

05-261 US.ST25.txt

<400> 45  
atggcttgcg caacattaaa gcgaacacat gactgggacc ccttgcacag tccgagtggc 60  
agatcgccga agcgacgccg atgtatgcct ctgtccccgc ctctacaag ggcgaccag 120  
atcgatccct cgcccttcgg agacgtgcca ccaaagttga cttcagagga gatagcagcc 180  
aacatccgtg aggagatgcg acggctacaa cggcgcaagc agctctgttt ccaggggctg 240  
gaccctgaat ccagcatac cagtggcttc tcgtcaccag tgcacgaga ccagcccctg 300  
ttcacgttcc gccaggttgg gtcatttgc gaacgaatga tgaaggagcg agagagcaag 360  
atacgggagg agtatgacca tgtgctatct accaaactcg cagaacagta cgacacattt 420  
gtcaagttaa cgtacgacca aa 442

<210> 46  
<211> 486  
<212> DNA  
<213> *Rhipicephalus sanguineus*

● <400> 46  
atggcttggtg cgacattaaa gcggacacac gactgggacc cgctgcacag tccgagtggc 60  
cgatcaccga agcgacgccg atgtatgcct ctgtccccac ctccaacaag ggcgaccag 120  
atcgatccct cgcccttcgg agacgtgcca ccaaagttga cttcagagga gatagcagcc 180  
aacatccgcg aggagatgcg acggctacaa cggcgcaagc agctctgttt ccagggcacc 240  
gaccctgaat gccagccgac cagtggcctc tcgtcaccgg tgcgtcgaga ccagcccctg 300  
ttcacgttcc gccaggttgg gtcatttgc gaacggatga tgaaggagcg agagagcaag 360  
atacgggagg agtacgacca cgtgctttcc accaagcttg cagaacagta cgacacgttt 420  
gttaagttaa cctacgacca aattcagaag cggtttgagg gtgctacgcc cagctatttg 480  
tcgtaa 486

● <210> 47  
<211> 498  
<212> DNA  
<213> *Dermacentor variabilis*

<400> 47  
atggcttggtg cgacattaaa gcggacacac gactgggatc ccctgcacag tccgaacggc 60  
agatcgccga aaagacggag atgtatgcct ctgtcagtct cccaccagc gcctccaaca 120  
agggcgacc aaatcaatcc ctgccgttt ggagaggtgc caccgaagt gacttcagag 180  
gagatagcag ccaacattcg cgaggagatg cgacggctgc aacggcgcaa gcagctctgc 240  
ttccaggggt ctgaccctga atcccagccc acaagcggcc tcttgtctcc cgtccgtcga 300  
gaccagcctc tgttcacctt tcgccagga gggctcattt gtgagcggat gatgaaggag 360  
cgagagagcc agatacggga ggagtacgac cacgtccttt ccaccaagct cgcagaacaa 420

201

05-261 US.ST25.txt

tacgacacat ttgttaaatt tacctatgac caaattcaga agcgggtatga ggggtgctacg 480  
cccagctatt tgtcgtaa 498

<210> 48  
<211> 498  
<212> DNA  
<213> Dermacentor marginatus

<400> 48  
atggccttggt cgacattaaa gcggactcac gactgggatc ccctgcacag tccgaacggc 60  
agatcgccga aaagacggag atgcatgcct ctgtcagtct cccaccagc gcctccaaca 120  
agggcgacc aaatcaatcc ctgcgcgttc ggagacgtgc cacctaagtt gacttcagag 180  
gagatagcag ccaacatccg cgaggagatg cgacggctgc aacggcgcaa gcagctctgc 240  
ttccagggga ctgaccctga atcccagccc acaagcggcc tcttatctcc ggtccgacga 300  
gaccagctc tggtcacctt tcgccaggtg gggctcattt gcgagcggat gatgaaggag 360  
cgagagagcc agatacggga ggagtacgac cacgtgcttt ccaccaagct cgcagaacaa 420  
tacgacacat ttgttaaatt tacctatgac caaattcaga agcgggttga ggggtgctacg 480  
cccagctatt tgtcgtaa 498

<210> 49  
<211> 448  
<212> DNA  
<213> Hyalomma marginatum marginatum 1

<400> 49  
atggccttgct caacattaaa gcgaacacac gactgggatc ccctgcacag tccgaatggc 60  
cgatcgccaa agagacggag gtgtatgccc ttgtccccac cagcacctcc aaccagggtc 120  
caccagatga atccatcgcc cttcggagaa gtgccgcccga agatgacttc agaggagata 180  
gcagccaaca ttgcgagga gatgcgacgg ctacaacggc gcaagcagct ctgtttccag 240  
gggacagacc cagaatcgca gcagacgagt ggcctcttgt cgcctgtccg tcgagaccag 300  
ccactgttca ctttccgcca ggtgggcctc atttgcgaac ggatgatgaa ggagcgagag 360  
agccagatac gggaggagta tgaccatgtg ctttctacca agcttgcagg acagtacgac 420  
acatttgtca agtttacgta cgaccaa 448

<210> 50  
<211> 448  
<212> DNA  
<213> Hyalomma marginatum marginatum 2

<400> 50  
atggccttgct caacattaaa gcgaacacac gactgggatc ccctgcacag tccgaatggc 60  
cgatcgccaa agagacggag gtgtatgccc ttgtccccac cagcacctcc aaccagggtc 120

70  
202

05-261 US.ST25.txt

caccagatga atccatcgcc cttcggagaa gtgccgccca agatgacttc agaggagata 180  
gcagccaaca ttcgcgagga gatgcgacgg ctacaacggc gcaagcagct ctgtttccag 240  
aggacagacc cagaatcgca gcagacgagt ggcctcttgt cgctgtccg tcgagaccag 300  
ccactgttca ctttccgccca ggtgggcctc atttgcgaac ggatgatgaa ggagcgagag 360  
agccagatac gggaggagta tgaccatgtg ctttctacca agcttgcaga acagtacgac 420  
acatttgtca agttttacgta cgaccaaaa 448

<210> 51  
<211> 540  
<212> DNA  
<213> Haemaphysalis punctata

<400> 51  
atggcttgtg cgacattaaa gcggacacac gattgggata ccctgcacag cccgaataga 60  
agatccccga aacgacgaag atgtatgcct ttgtcggtta ctccaactcc cccaacaagg 120  
gcgcaccaga tcaacccttc gcccttcggc gacgtccac cgaagttgac ttcagaggag 180  
attgcggcca acatccggga ggagatgcgg cggctgcagc ggcgtaagca gctctgcttc 240  
caggcgggtg ctgagggcag ccccgctcgt gggggagact cccccgttgg ttccccagc 300  
tcctctcac aggcggtggt cctcctgtca cccatgcgcc gtgaccagcc cctgttcacc 360  
ttccgccaag ttgggcttat ctgcgagcgg atgatgaagg aacgggagag ccagatacgc 420  
gaggagtatg accacgtgct ctccaccaa ctggccgagc agtacgacac atttgtaaa 480  
cttacctacg accagatcca gaagcgattt gagggtgcta cgcccagcta tttgtcgtaa 540

<210> 52  
<211> 184  
<212> PRT  
<213> Ixodes ricinus

<400> 52  
Met Ala Cys Ala Thr Leu Lys Arg Thr His Asp Trp Asp Pro Leu His  
1 5 10 15  
Ser Pro Asn Gly Arg Ser Pro Lys Arg Arg Arg Cys Met Pro Leu Ser  
20 25 30  
Val Thr Gln Ala Ala Thr Pro Pro Thr Arg Ala His Gln Ile Asn Pro  
35 40 45  
Ser Pro Phe Gly Glu Val Pro Pro Lys Leu Thr Ser Glu Glu Ile Ala  
50 55 60

102

103

05-261 US.ST25.txt

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Thr Pro Ser Tyr Leu Ser  
180

<210> 53  
<211> 147  
<212> PRT  
<213> Boophilus microplus Cepich  
<400> 53

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

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

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

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

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

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

23  
204

05-261 US.ST25.txt  
Asp Gln Pro Leu Phe Thr Phe Arg Gln Val Gly Leu Ile Cys Glu Arg  
100 105 110

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

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

Tyr Asp Gln  
145

<210> 54  
<211> 147  
<212> PRT  
<213> Boophilus microplus Muñoz  
<400> 54

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Asp Gln  
145

205

05-261 US.ST25.txt

<210> 55  
<211> 147  
<212> PRT  
<213> Boophilus microplus S. Lucia

<400> 55

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Asp Gln  
145

<210> 56  
<211> 147  
<212> PRT  
<213> Boophilus microplus Susceptible

<400> 56

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

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

Pro Pro Pro Thr Arg Ala His Gln Ile Asp Pro Ser Pro Phe Gly Asp  
Page 44

206

05-261 US.ST25.txt  
45

35

40

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

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

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

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

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

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

Tyr Asp Gln  
145

<210> 57  
<211> 161  
<212> PRT  
<213> Rhipicephalus sanguineus  
<400> 57

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

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

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

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

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

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

Asp Gln Pro Leu Phe Thr Phe Arg Gln Val Gly Leu Ile Cys Glu Arg  
Page 45

207

207

100 05-261 US.ST25.txt 110  
105

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

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

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

.Ser

<210> 58  
<211> 165  
<212> PRT  
<213> Dermacentor variabilis

400> 58

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

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

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

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

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

Phe Gln Gly Ser Asp Pro Glu Ser Gln Pro Thr Ser Gly Leu Leu Ser  
85 90 95

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

Ile Cys Glu Arg Met Met Lys Glu Arg Glu Ser Gln Ile Arg Glu Glu  
115 120 125

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

Val Lys Phe Thr Tyr Asp Gln Ile Gln Lys Arg Tyr Glu Gly Ala Thr  
Page 46

145 150 05-261 US-ST25.txt 155 160

|       |                               |
|-------|-------------------------------|
| <210> | 59                            |
| <211> | 165                           |
| <212> | PRT                           |
| <213> | <b>Dermacentor marginatus</b> |
| <400> | 59                            |

<210> 60  
<211> 149  
<212> PKT  
<213> Hyalomma marginatum marginatum 1

209

05-261 US.ST25.txt

<400> 60

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

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

Pro Pro Ala Pro Pro Thr Arg Ala His Gln Met Asn Pro Ser Pro Phe  
35 40 45

Gly Glu Val Pro Pro Lys Met Thr Ser Glu Glu Ile Ala Ala Asn Ile  
50 55 60

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

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

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

Glu Arg Met Met Lys Glu Arg Glu Ser Gln Ile Arg Glu Glu Tyr Asp  
115 120 125

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

Phe Thr Tyr Asp Gln  
145

<210> 61

<211> 149

<212> PRT

<213> Hyalomma marginatum marginatum 2

<400> 61

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

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

Pro Pro Ala Pro Pro Thr Arg Ala His Gln Met Asn Pro Ser Pro Phe  
35 40 45

Gly Glu Val Pro Pro Lys Met Thr Ser Glu Glu Ile Ala Ala Asn Ile  
50 55 60

Page 48

210

05-261 US.ST25.txt

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

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

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

Glu Arg Met Met Lys Glu Arg Glu Ser Gln Ile Arg Glu Glu Tyr Asp  
115 120 125

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

Phe Thr Tyr Asp Gln  
145

<210> 62  
<211> 179  
<212> PRT  
<213> Haemaphysalis punctata  
<400> 62

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

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

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

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

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

Gln Ala Gly Ala Glu Gly Ser Pro Val Gly Gly Gly Asp Ser Pro Val  
85 90 95

Gly Ser Pro Ser Ser Ser Ser Gln Ala Gly Gly Leu Leu Ser Pro Met  
100 105 110

Arg Arg Asp Gln Pro Leu Phe Thr Phe Arg Gln Val Gly Leu Ile Cys  
115 120 125

211

05-261 US.ST25.txt

Glu Arg Met Met Lys Glu Arg Glu Ser Gln Ile Arg Glu Glu Tyr Asp  
130 135 140  
His Val Leu Ser Thr Lys Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Thr Phe Val Lys  
145 150 155 160  
Leu Thr Tyr Asp Gln Ile Gln Lys Arg Phe Glu Gly Ala Thr Pro Ser  
165 170 175  
Tyr Leu Ser

ESTADOS UNID S DE AMERICA

A TODOS CUANTOS LA PRESENTE VIEREN:

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

04 de agosto del 2006

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

NUMERO DE SOLICITUD: 11/197,133

FECHA DE PRESENTACION: 04 de agosto del 2005

EL CODIGO DEL PAIS Y EL NUMERO DE SU SOLICITUD DE PRIORIDAD, PARA SER UTILIZADOS PARA PRESENTACION EN EL EXTRANJERO BAJO LA CONVENCION DE PARIS, ES US11/197,133

Por Poder del

Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual  
y Director de La Oficina de Patentes y Marcas de los  
Estados Unidos

(Firmado)

(SELLO)

E. BORNETT

Funcionario que Certifica

212

## CERTIFICACION BAJO 37 C.F.R. Y 1.10

Por la presente certifico que, en la fecha mostrada enseguida, esta correspondencia está esta siendo depositada con el servicio postal de los Estados Unidos en un sobre dirigido a: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alejandría, VA 22313-1450 como "Oficio Postal de Correo Exprés al Destinatario" Etiqueta de Correo No. EV 16755486US el 4 de Agosto del 2005.

(Firmado)

LUZ C. BRAUNSTEINER

(nombre escrito o impreso de la  
persona que certifica)

## Clasificación Preliminar:

Clase propuesta:

Subclase:

NOTA: "Todos los solicitantes son solicitados para incluir una clasificación preliminar en la solicitudes de patentes recientemente presentadas. La clasificación preliminar, de preferencia las designaciones de clase y subclase, deben ser identificadas en la esquina derecha superior de la carta de transmisión que acompaña los documentos de la solicitud, por ejemplo 'Clase 2, subclase 129 propuesta' M.P.E.P. Sección 601, 7th ed.

~~139~~  
214

EN LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS  
Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alejandría, VA 22313-1450

NUEVA TRANSMISION DE SOLICITUD

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

Inventor(es): José de Jesús DE LA FUENTE

Catherine M. KOCAN

Consuelo GARCIA-ALMAZAN

Edmour F. BLOUIN

Para(Título): ANTIGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL  
CONTROL DE INFESTACIONES DE GARRAPATAS MULTI ESPECIES

**1. Tipo de Solicitud**

Esta nueva solicitud es para un(a)

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

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

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

- ☒ La nueva solicitud es transmitida con las reivindicaciones para el beneficio de la solicitud(es) norteamericana(s) previa(s)

Esta solicitud es una continuación en parte de la solicitud correspondiente No. de Serie 10/972,789, presentada el 25/10/2004; que en parte es una continuación en parte de la solicitud correspondiente No. de Serie 10/425/563, presentada el 29/04/2003; que en parte es una no provisí nal de la solicitud correspodiente No. de Serie 60/376/251, presentada el 29/04/2002.

**3. Documentos Adjuntos**

156  
216

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

38 Páginas de Especificación

2 Páginas de Reivindicaciones

1 Páginas de Extracto

4 Hojas de Dibujos [Formal]

[ ] El(los) dibujo(s) Adjunto(s) son fotografía(s), y  
también está adjunta una "PETICIÓN PARA ACEPTAR  
FOTOGRAFIA(S) COMO DIBUJO(S)." 37 C.F.R. Sección  
1.48(b)

[ ] Formal

[ ] Informal

217 

PATENTE

Expediente No.: 57338/05-261

Página 3 de 9

**B. Otros Documentos Adjuntos**

- ☐ Páginas de declaración y poder del apoderado
- ☐ Páginas de sesión
- ☐ Petición de no Publicación y Certificación bajo 35 U.S.C. 122(b) (2) (B) (i)
- ☒ Hojas de de Datos de la Solicitud Inicial (4 pg)
- ☐ Ninguno
- ☐ Otro

**4. Documentos Adicionales Adjuntos**

- ☐ Enmiendas para reivindicaciones
  - ☐ Cancelar en estas solicitudes las reivindicaciones ☐ antes de calcular los derechos de presentación. (Por lo menos una reivindicación independiente original debe ser retenida para propósitos de presentación).
  - ☐ Adicionar las reivindicaciones mostradas en la enmienda adjunta. (Las reivindicaciones adicionadas se han numerado consecutivamente siguiendo las reivindicaciones originales con el número más alto).

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

219 ~~28~~<sup>9</sup>

[ ] representante legal del(los) inventor(es). 37

C.F.R. Sección 1.42 a 1.43.

PATENTE

Expediente No.: 57338/05-261

Página 4 de 9

☐ inventor conjunto o persona que muestra un interés de propiedad a favor del inventor quien rechazo firmar o no puede ser contactado.

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

☒ No Adjunto.

☐ La Solicitud se hace por una persona autorizada bajo 37 C.F.R. 1.41 a favor de todos los inventores mencionados en lo anterior.

☐ Que muestra que la presentación está autorizada

6. Lenguaje

☒ Inglés

☐ No en Inglés

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

221 *[Handwritten signature]*

**7. Cesión**

☒ Una cesión de la invención a

☐ está adjunta. A separate

☐ una "HOJA DE CUBIERTA PARA CESION  
(DOCUMENTO) QUE ACOMPAÑA LA NUEVA  
SOLICITUD DE PATENTE" o

☐ FORMA PTO 1595 separada también está  
adjunta.

☒ continuará.

☐ Cesión previamente registrada en \_\_\_\_\_ en el  
Carrete\_\_\_\_\_/Cuadro\_\_\_\_\_.

**8. Copia Certificada**

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

País:

No. de Solicitud:

Presentado:

de la cual la prioridad se reclama

☐ está (están) adjunta.

☐ continuará.

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

**A. Derechos de Presentación Básica**

☐ Derechos de presentación básica - utilidad

(Código de Derechos 1011/2011 — \$300.00;

entidad pequeña \$150.00) \$\_\_\_\_\_

☐ Derechos de presentación básica - diseño

(Código de Derechos 1011/2011 — \$200.00;

entidad pequeña \$100.00) \$\_\_\_\_\_

☐ Derechos de presentación básica - diseño (CPA)

(Código de Derechos 1017/2017 — \$200.00;

entidad pequeña \$100.00) \$\_\_\_\_\_

☐ Derechos de presentación básica - planta

(Código de Derechos 1013/2013 — \$200.00;

entidad pequeña \$100.00) \$\_\_\_\_\_

☐ Derechos de presentación básica - reexpedición

(Código de Derechos 1014/2014 — \$300.00;

entidad pequeña \$150.00) \$\_\_\_\_\_

☐ Derechos de presentación básica - reexpedición

(CPA)

(Código de Derechos 1019/2019 — \$300.00;  
entidad pequeña \$150.00) \$\_\_\_\_\_

**B. Derechos de Búsqueda de Patente**

☐ Derechos de Búsqueda de Utilidad

(Código de Derechos 1011/2111 — \$500.00; entidad  
pequeña \$250.00) \$\_\_\_\_\_

☐ Derechos de Búsqueda de Diseño

(Código de Derechos 1012/2112 — \$100.00; entidad  
pequeña \$50.00) \$\_\_\_\_\_

☐ Derechos de Búsqueda de Planta

(Código de Derechos 1013/2113 — \$300.00; entidad  
pequeña \$150.00) \$\_\_\_\_\_

☐ Derechos de Búsqueda de Reexpedición

(Código de Derechos 1014/2114 — \$500.00; entidad  
pequeña \$250.00) \$\_\_\_\_\_

## PATENTE

Expediente No.: 57338/05-261

Página 6 de 9

**C. Derechos de Examen de Patente**☐ **Derechos de Examen de Utilidad**

(Código de Derechos 1311/2311 — \$200.00; entidad  
pequeña \$100.00) \$ \_\_\_\_\_

☐ **Derechos de Examen de Diseño**

(Código de Derechos 1312/2312 — \$130.00; entidad  
pequeña \$65.00) \$ \_\_\_\_\_

☐ **Derechos de Examen de Planta**

(Código de Derechos 1313/2313 — \$160.00; entidad  
pequeña \$80.00) \$ \_\_\_\_\_

☐ **Derechos de Examen de Reexpedición**

(Código de Derechos 1314/2314 — \$600.00; entidad  
pequeña \$300.00) \$ \_\_\_\_\_

**D. Derechos para reivindicaciones**☐ **Reivindicaciones independientes por arriba de tres (3)**

(Código de Derechos 1201/2201 — \$200.00; entidad  
pequeña \$100.00) \$ \_\_\_\_\_

☐ **Reivindicaciones por arriba de veinte (20)**

(Código de Derechos 1202/2202 — \$50.00; entidad  
pequeña \$25.00) \$ \_\_\_\_\_

☐ **Reivindicaciones dependientes múltiples**

(Código de Derechos 1203/2203 — \$360.00; entidad  
pequeña \$180.00) \$ \_\_\_\_\_

**E. Derechos Misceláneos**

- [ ] Sobrecargo - Derecho de presentación tardía o juramento  
o declaración

(Código de Derechos 1051/2051 — \$130.00-; entidad  
pequeña \$65.00) \$ \_\_\_\_\_

- [ ] Envío de una Declaración de Descripción de Información

(Código de Derechos 1806 — \$180.00 ambas entidades  
\$ \_\_\_\_\_

- [ ] Derechos de Tamaño de Solicitud de Utilidad - para cada  
50 hojas adicionales que excede 100 hojas

(Código de Derechos 1081/2081 — \$2500.00; entidad  
pequeña-- \$125.00) \$ \_\_\_\_\_

PATENTE

Expediente No.: 57338/05-261

Página 7 de 9

☐ **Derechos de Patentes Misceláneos**

Derechos de procesamiento, excepto en solicitudes provisionales,

(Códigos de Derechos 1808 — \$130.00 ambas entidades) \$\_\_\_\_\_

Derechos de terminación total \$\_\_\_\_\_

**10. Declaración(es) de Entidad Pequeña**

☐ La declaración de entidad pequeña es reclamada en este tiempo.

☒ La declaración de entidad pequeña no es reclamada en este tiempo.

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

*(complete, si es aplicable)*

☐ Favor de preparar un reporte de búsqueda de tipo internacional para esta solicitud en el tiempo cuando toma lugar el examen nacional sobre los meritos.

**12. Pago de Derechos que se hace en Este Tiempo**

☒ No Adjunto

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

227 ~~98~~

☐ Adjunto

☐ Derechos de Presentación Básica \$\_\_\_\_\_

☐ Derechos de Búsqueda de Patente \$\_\_\_\_\_

☐ Derechos de Examen de Patente \$\_\_\_\_\_

☐ Derechos para Reivindicaciones \$\_\_\_\_\_

☐ Derechos de Patentes Misceláneos

(Derechos de Procesamiento) \$\_\_\_\_\_

☐ Derechos Pagados en el Tiempo

de la Presentación de la Solicitud \$\_\_\_\_\_

Derechos Totales Adjuntos \$\_\_\_\_\_

228~~80~~

PATENTE

Expediente No.: 57338/05-261

Página 8 de 9

**13. Método de Pago de Derechos**

- ☐ Marcar en la cantidad de \$\_\_\_\_\_.
- ☐ Cargar a la Cuenta No. \_\_\_\_\_ en la cantidad de \$\_\_\_\_\_
- ☐ Un duplicado de esta petición está adjunto.
- ☐ Cargar o Acreditar a la Tarjeta la cantidad de \$\_\_\_\_\_
- ☐ Forma PTO-2038 está adjunta por duplicado.
- ☐ Por favor cargar a la Cuenta No. \_\_\_\_\_ para cualquiera de los derechos y/o deficiencias que pueden ser debido por este documento.

**14. Autorización para Cargar Derechos Adicionales**

- ☐ El Comisionado está autorizado para la presente para cargar los siguientes derechos adicionales por este documento y durante la pendencia completa de esta solicitud a la Cuenta No..
- ☐ 37 C.F.R.Sección 1.16(a), (f) o (g) (derechos de presentación)
- ☐ 37 C.F.R.Sección 1.16(b), (c) o (d) (presentación de reivindicaciones extras)
- ☐ 37 C.F.R.Sección 1.16(e) (sobre cargo para presentar los derechos de presentación básicos)

y/o declaración en una fecha posterior que la  
fecha de presentación de la solicitud

☐ 37 C.F.R.Sección 1.16(a)(1)(5) (derechos de  
extensión conforme a la Sección 1.136(a).

☐ 37 C.F.R.Sección 1.17 (derechos de  
procesamiento de la solicitud)

☐ 37 C.F.R.Sección 1.18 (derechos de expedición  
en o antes de enviar la notificación de  
autorización, conforme a 37 C.F.R.Sección  
1.311(b))

**15. Instrucciones en cuanto al Sobre pago**

☐ Cuanta de Crédito No. \_\_\_\_\_.

☐ Reembolso

**16. Dirección de Correspondencia**

Cliente No. 22206

230 P

PATENTE

Expediente No.: 57338/05-261

Página 9 de 9

Respetuosamente enviado,

4/8/05

FECHA

Reg: No.: 36,050

Tel: No.: (918)599-0621

Cliente No.: 22206

322518.1

FIRMA DEL PROFESIONAL

R. Alan Weeks

(nombre escrito e impreso del  
profesional)

321 S. Boston Ave. Suite 800

P.O. Address

Tulsa. OK 74103-3318

231 A

**Hoja de Datos de la Solicitud**

**Información de la Solicitud**

Tipo de Solicitud:: Regular  
Materia Sujeto:: Utilidad  
Clasificación Sugerida::  
Unidad del Grupo Técnico Sugerida::  
¿Presentación de secuencia?:: Papel  
¿Forma Leíble en Computadora (CRF)?:: Si  
Número de copias de CRF:: Una  
Título:: Antígenos protectores y  
vacunas para el control de  
infestaciones de garrapatas  
multiespecies  
Número de Expediente del Apoderado:: 57338/05-261  
Petición para Publicación Temprana:: No  
Petición para No Publicación:: No  
Figura de Dibujo Sugerida::  
Hojas de Dibujos Totales:: 4  
¿Entidad Pequeña?:: No  
¿Petición incluida? No  
¿Orden de Secreto en la Solicitud  
de Origen?:: No

**Información del Solicitante**

Tipo de Autoridad del Solicitante Uno:: Inventor

232 \$

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

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

Ciudad de la dirección de correo:: Perkins

Estado o Provincia de la dirección  
de correo::

OK

País de la dirección de correo:: EUA

Código Postal de la dirección de

Correo:: 74059

Tipo de Autoridad del Solicitante Tres:: Inventor

País de Ciudadanía Primaria:: México

Estado:: Capacidad Completa

Nombre:: Consuelo

Apellido:: García-Almazán

Ciudad de Residencia:: Stillwater

Estado o Provincia de Residencia:: OK

País de Residencia:: EUA

Calle de la dirección de correo:: S. 81 University Place,  
Apt. #1

Ciudad de la dirección de correo:: Stillwater

Estado o Provincia de la dirección  
de correo::

OK

País de la dirección de correo:: EUA

Código Postal de la dirección de

Correo:: 74075

Tipo de Autoridad del Solicitante Cuatro:: Inventor

**País de Ciudadanía Primaria::** EUA  
**Estado::** Capacidad Completa  
**Nombre::** Edmour F.  
**Apellido::** Blouin  
**Ciudad de Residencia::** Perkins  
**Estado o Provincia de Residencia::** OK  
**País de Residencia::** EUA  
**Calle de la dirección de correo::** 3909 E. 92nd Street  
**Ciudad de la dirección de correo::** Perkins  
**Estado o Provincia de la dirección de correo::** OK  
**País de la dirección de correo::** EUA  
**Código Postal de la dirección de Correo::** 74059

**Información de Correspondencia**

**Número del Cliente de Correspondencia::** 22206

**Información Representativa**

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| <b>Número del Cliente</b> | 22206 |
| <b>Representativo:</b>    |       |

**Información de Prioridad Nacional**

|                   |                      |                    |                     |
|-------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| <b>Solicitud:</b> | <b>Tipo de</b>       | <b>Solicitud</b>   | <b>Presentación</b> |
|                   | <b>Continuidad::</b> | <b>Principal::</b> | <b>Principal::</b>  |

235 ✓

|            |                          |            |            |
|------------|--------------------------|------------|------------|
|            | Continuación<br>en parte | 10/972,789 | 25/10/2004 |
| 10/972,789 | Continuación<br>en parte | 10/425,563 | 29/04/2003 |
| 10/425.563 | No Provisional<br>de     | 60/376,251 | 29/04/2002 |

**Información de Prioridad Extranjera**

| País:: | Número de<br>Solicitud:: | Fecha de<br>Presentación:: | Prioridad<br>Reclamada:: |
|--------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
|        |                          |                            | Si o No                  |

**Información del Cesionario**

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

322523.1

Inicial 4 de agosto del 2005

**ANTIGENOS PROTECTORES Y VACUNAS PARA EL CONTROL DE  
INFESTACIONES DE GARRAPATAS MULTIESPECIES  
REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

[0001] Esta solicitud es una continuación en parte  
5 de la Solicitud de Patente Norteamericana copendiente No. de  
Serie 10/972,789, presentada el 25 de octubre del 2004, esta  
solicitud que es una continuación en parte de la Solicitud de  
Patente Norteamericana copendiente No. de Serie 10/425,563,  
presentada el 19 de abril del 2003, esta solicitud que  
10 reclama el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional  
Norteamericana copendiente No. de Serie 60/376,251,  
presentada el 29 de abril del 2002. Todas las solicitudes de  
prioridad mencionadas son incorporadas en la presente por  
referencia.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

**Campo Técnico:**

[0002] La presente invención se relaciona a la  
identificación de antígenos protectores contra infestaciones  
de garrapatas, secuencias de genes y proteínas codificadas  
20 para tales antígenos, vacunas relacionadas y métodos útiles  
para inducir una respuesta inmune en mamíferos, que son  
protectores contra una amplia gama de especies de garrapatas.  
Esta solicitud suplementa su solicitud de origen al  
proporcionar datos adicionales, incluyendo secuencias  
25 derivadas de varias especies de garrapatas y cepas,

relacionadas con el antígeno designado 4D8.

Antecedentes:

[0003] 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 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 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 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 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.*

[0004] 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 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 Fuente y colaboradores, 1998; Garcia-Garcia 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).

[0005] 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  
5 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  
10 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 garrapatas a través de especies filogenéticamente distantes (de la Fuente y Kocan  
15 2004).

[0006] En la solicitud de prioridad No. de serie 10/425,563 los inventores describieron la identificación mediante ELI y el análisis de secuencia de clones de cDNA protectores contra infestaciones experimentales con *I.*  
20 *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 protectores, aunque identificados por *I. scapularis*, podrían ser protectores cruzadamente entre las especies *Ixodes*  
25 considerando el alto grado de conservación de las secuencias

de genes y la función de proteína entre las especies del mismo género.

[0007] 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 formulaciones de vacunas anti-garrapatas de amplia gama.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

10 [0008] En la solicitud de prioridad No. de Serie 10/425,563, numerosos antígenos protectores derivados de *I. scapularis* se identificaron y mostraron que poseen propiedades protectoras contra las infestaciones de garrapatas *I. scapularis*. Entre estos antígenos estuvieron  
15 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 extiende a otras especies de garrapatas, y en el caso de 4D8, 4F8 y 4E6 a especies de garrapatas no de *Ixodes*. Además, se  
20 proporcionan las secuencias recientemente descubiertas (DNA y proteína) del antígeno 4D8 protector de garrapatas derivado del género *Rhipicephalus*, particularmente *Rhipicephalus appendiculatus*. En esta solicitud, se proporcionan secuencias adicionales y datos derivados de otras especies de garrapatas  
25 de los géneros *Boophilus*, *Dermacentor*, *Ixodes*, *Rhipicephalus*,

*Hyalomma* y *Haemaphysalis* relacionados con el antígeno designado 4D8, junto con comparaciones de homología.

[0009] La conservación de secuencia y expresión de 4F8, 4D8 y 4E6 se analizaron en las especies relacionadas con  
5 *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  
*I. scapularis* conocidas. La expresión se detectó en  
*I. ricinus* para todos los tres genes y en *I. pacificus* para  
10 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  
*B. microplus* se clonaron y se secuenciaron. En esta  
solicitud, datos adicionales en la conservación de secuencia  
15 4D8 se proporcionan en la Tabla 8.

[0010] 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  
20 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.

[0011] Por consiguiente, en una modalidad de la  
25 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.

[0012] 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.

[0013] 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 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  
patógenos transmitidos por garrapatas para proporcionar un  
medio para controlar las infestaciones de garrapatas, y para  
5 reducir la transmisión a humanos de infecciones transmitidas  
por garrapatas, en donde la composición de vacuna además  
comprende un portador o diluyente farmacéuticamente  
aceptable.

[0014] Un mejor entendimiento de la presente  
10 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  
15 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 descripción debe ser  
considerada como de naturaleza ilustrativa y no como  
20 restrictiva.

#### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0015] La Fig. 1 es un resumen del procedimiento  
ELI de cDNA utilizado para identificar antígenos protectores  
contra infestaciones de *I. scapularis*.

25 [0016] La FIG. 2A es una gráfica que representa los

resultados de una clasificación detección primaria de acumulaciones de cDNA (A-H 1-4, A5) mediante ELI. V, ratones de control inyectados con 1  $\mu$ g de DNA de vector solo.  $*\alpha < 0.10$ ,  $**\alpha < 0.05$  (prueba *post-hoc* de Tukey para 5 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.

[0017] La FIG. 2B es una gráfica que representa los resultados de una clasificación primaria de acumulaciones de 10 cDNA (A6-A10, B-H 5-8) mediante ELI. V, ratones de control inyectados con 1  $\mu$ g de DNA de vector solo.  $*\alpha < 0.01$ ,  $**\alpha < 0.05$  (prueba de *post-hoc* de Tukey para comparaciones de pares después de ANOVA). Los números en cuadro representan valores para inhibición de infestación de garrapatas con respecto al 15 grupo de control.

[0018] La FIG. 3 es una gráfica que representa los resultados de una clasificación terciaria mediante ELI de sub-acumulaciones de cDNA formadas de acuerdo con la función predicha de proteínas codificadas. Solamente los grupos con 20  $I_{\geq 15\%}$  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 mitocondrícos (MT).  $*P \leq 0.05$  (prueba T del Estudiante).

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

25 [0019] Antes de explicar la presente invención en

245

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.

[0020] 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.

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

*Células de garrapata*

[0021] Monocapas de células IDE8 (ATCC CRL 1973), 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 25 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

[0022] Una librería de expresión de cDNA se construyó en el vector pEXP1 que contiene el promotor CMV<sub>IR</sub> 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* embriónico cultivadas. La librería de cDNA contuvo  $4.4 \times 10^6$  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).

#### 15 Clasificación o Detección primaria

[0023] 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.

20 [0024] 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  
25 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.

10                    [0025] 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  $50 \pm 13$  y  $56 \pm 15$  y  $56 \pm 15$  y  $54 \pm 18$  larvas/ratón para ratones  
15 inmunizados con cDNA y de control, respectivamente ( $P > 0.05$ ) (Tabla 1). El número promedio de larvas engordadas recuperadas por ratón fue  $9 \pm 3$  y  $13 \pm 4$  en los ratones inmunizados con cDNA y  $16 \pm 4$  y  $17 \pm 3$  en el grupo inmunizado con el vector de control ( $P < 0.05$ ) (Tabla 1). No se observó  
20 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. Sin embargo, en los ratones inmunizados con acumulaciones de  
25 cDNA B5, A8 y A10 (Fig. 2) se registró un retardo de

desarroll 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 acumulaciones (2705 clones), 9 acumulaciones protectoras (351 clones) se seleccionaron produciendo una inhibición de la infestación de garrapatas  $\geq 60\%$  (Fig. 2A y 2B en la Tabla 1). Cuando los inventores iniciaron estos experimentos, los inventores planearon clasificar arriba de 4000 clones de cDNA 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 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). Debido a la complejidad del procedimiento de clasificación en 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 atención en las 9 acumulaciones seleccionadas después de la clasificación primaria.

### *Clasificación secundaria*

[0026] La clasificación secundaria se hizo para verificar la capacidad protectora de las acumulaciones de cDNA 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  $I_{>60\%}$  se seleccionaron para la clasificación secundaria (re-clasificación) empleando 5 ratones por grupo como es 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 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 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  $\mu$ g de proteínas de células de garrapata IDE8 totales por dosis en el adyuvante incompleto de Freund.

[0027] 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  $85 \pm 6$  y  $84 \pm 3$  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  $39 \pm 7$  y  $26 \pm 6$  para ratones de control y ratones inmunizados con cDNA, respectivamente ( $P < 0.05$ ). El grupo inmunizado con las 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 con solución salina.

[0028] 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 con cDNA de prueba comparado con el grupo inmunizado con cDNA 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*

[0029] 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  $\mu\text{g}$ /plásmido/dosis en 50  $\mu\text{l}$  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 mitocondrial.

[0030] Los niveles de infestación de garrapatas fueron similares en todos los grupos de prueba ( $72 \pm 2$  larvas/ratón) y en los grupos de control ( $69 \pm 2$  larvas/ratón) ( $P > 0.05$ ). El número de larvas engordadas recuperadas por ratón también fue similar entre los ratones de prueba ( $16 \pm 7$ )

y de control ( $14 \pm 6$ ) ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, los grupos inmunizados con sub-acumulaciones de cDNA que contienen clones con endopeptidasa putativa, nucleotidasa, proteínas ribosomales, 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 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 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*

[0031] 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 mitocondrícos (clasificación terciaria).

*Ejemplo 2: Análisis de secuencia de clones protectores*

[0032] 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.

[0033] 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*

[0034] 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.

[0035] 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  
5 codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 2.

[0036] 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.

10 [0037] 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.

[0038] SEQ ID NO: 7 denota el clon designado 4G11,  
15 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.

[0039] SEQ ID NO: 9 denota el clon designado 4D6, en donde el fragmento que codifica la proteína relevante se  
20 ha identificado que comprende los residuos 198-1025, que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 10.

[0040] SEQ ID NO: 11 denota el clon designado 3E1, en donde el fragmento que codifica la proteína relevante se ha identificado que comprende los residuos 3-578, que  
25 codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 12.

257

[0041] 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 el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 14.

5 [0042] 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.

10 [0043] 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.

15 [0044] SEQ ID NO: 19 denota el clon designado 3C12, en 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.

20 [0045] SEQ ID NO: 21 denota el clon designado 2C12, en donde el fragmento que codifica la proteína relevante se ha identificado que comprende los residuos 3-137, que codifica el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 22.

[0046] 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.

25 [0047] Ahora se ha descubierto que ciertos de 1 s 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 anti-garrapata de amplia gama.

5        **Ejemplo 3: Extensión de Antígenos protectores de *I. scapularis* A Otras Especies de Garrapatas**

**Métodos**

**Extracción de RNA y transcripción inversa (RT)-PCR**

[0048] El RNA total se extrajo de los intestinos y  
10 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 disectadas de 10 machos de *D. variabilis*, glándulas  
15 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 utilizan el TRI Reagen (Sigma), excepto para  
20 el RNA de *I. 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-  
25 100 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  $\mu$ l de RNA se transcribió inversamente en una mezcla de reacción de 50  $\mu$ l ( $\text{MgSO}_4$  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 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*

[0049] 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*

[0050] 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*

[0051] 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).

[0052] 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*

[0053] 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.

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

[0054] La detección de la expresión de 4D8 y 4E6 en 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 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 un afectó las infestaciones de ninfales de *I. scapularis* solamente y el efecto de la inmunización 4E6 se reflejó en las infectaciones de *A. americanum* y en el peso de las ninfas engordadas de *D. variabilis* (Tabla 7). El efecto sinérgico de la inmunización con todos los tres antígenos se observó para 4D8 en las ninfas de *I. scapularis* (Tabla 7).

\* \* \* \* \*

[0055] El experimento 3, entonces, demuestra la utilidad sorprendente de utilizar los antígenos protectores de garrapata de *I. scapularis* 4D8, 4F8 y 4E6 en formulaciones de vacuna para el control de múltiples especies de garrapatas.

[0056] 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. Lucia, *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%.

[0057] 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, 5 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 10 secuencia sea capaz de inducir un anticuerpo u otra respuesta inmune que reconoce un(os) epítotope(s) de las secuencias de aminoácidos dadas.

[0058] Como resultado, la invención comprende secuencias de ADN que codifican para y/o expresan en células 15 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.

20 [0059] Como será apreciado por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica, una secuencia de nucleótidos que codifica los antígenos inventivos o variantes de los mismos pueden diferir de las secuencias nativas presentadas en la presente debido a las degeneraciones de 25 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

5 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.

10 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

15 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)

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

25 c).

[0060] Las proteínas incluidas dentro de la presente 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) epítotope(s) de las secuencias de aminoácidos representadas y un mutante de la secuencia capaz de inducir un anticuerpo u otra respuesta inmune que reconoce un(os) epítotope(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, "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, InformMax, North Bethesda, MD, EUA), BLAST (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.

[0061] 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

268 928

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  
5 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)  
10 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  
15 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.

20 [0062] 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 emplear para transformar un hospedero apropiado para permitir al hospedero a expresar la proteína. Ejemplos de organismos  
25 de hospederos y células incluyen cepas bacterianas (por

ejemplo, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Salmonella*, etc.), 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  
5 considera que está dentro del alcance de aquellos expertos en la técnica.

[0063] 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  
10 que es codificada dentro de la terminología mencionada, siendo suficiente que la proteína expresada sea capaz de inducir un anticuerpo u otra respuesta inmune que reconoce un(os) epítoto(s) de las secuencias de aminoácidos listadas.

[0064] Los cDNAs aislados y/o polipéptido expresado  
15 por el hospedero transformado por el vector se pueden recolectar por métodos que se les presentarán aquellos expertos en la 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  
20 de *Ixodes* y no de *Ixodes*. Tales proteínas recombinantes protectoras y/o cDNAs modificado se utiliza en una cantidad efectiva para inducir una respuesta inmune contra tales garrapatas y sus patógenos asociados y se pueden utilizar en combinación con un portador fisiológicamente aceptable  
25 adecuado. El término "inducción de una respuesta inmune"

cuando se utiliza con respecto a la vacuna descrita en la presente significa que la vacuna previene la enfermedad asociada con una especie de garrapata particular o reduce la severidad de la enfermedad.

5           [0065] El portador empleado en conjunción con la vacuna puede ser cualquiera de una amplia variedad de portadores. Como ejemplos representativos de portadores adecuados, se pueden mencionar aceite mineral, polímeros sintéticos, etc. Los portadores para vacunas son bien  
10 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 de la manera en la cual se va ha administrar la vacuna.

15           [0066] 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 se administra en una cantidad efectiva.  
20 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 administrada intranasalmente u oralmente. También  
25 se va a 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.

[0067] 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 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 presente por referencia:

- 15 Alberti E, Acosta A, Sarmiento ME, Hidalgo C, Vidal T, Fachado A, Fonte L, Izquierdo L, Infante JF, Finlay CM, Sierra G. Specific cellular and humoral immune response in Balb/c mice immunised with an expression genomic library of *Trypanosoma cruzi*. Vaccine 1998; 16:608-12.
- 20 Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, de la Fuente J. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. Vaccine 21, 1492-1501 (2003).
- 25 Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF,

- de la Fuente J. Characterization of genes transcribed in an *Ixodes scapularis* cell line that were identified by expression library immunization and analysis of expressed sequence tags. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 7:9-25 (2000).
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215:403-10.
- Barry MA, Lai WC, Johnston SA. Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature* 1995; 377:632-5.
- Black WC 4th, Piesman J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci 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, Bruno L, Cloeckert A, Bowden RA, Spitz M, Fossati CA. Immunogenicity of the *Brucella melitensis* recombinant ribosome recycling factor-homologous protein and its cDNA. *Vaccine* 2002; 20: 1660-9.
- de la Fuente J, Kocan KM. 2003. Advances in the identification and characterization of protective antigens for development of recombinant vaccines against

- tick infestations. *Expert Review of Vaccines*. 2:583-593.
- de la Fuente J, 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.
- 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* 1999; 15: 143-8.
- de la Fuente J, Rodriguez M, Garcia-Garcia JC. Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 916: 617-21.
- De Rose R, McKenna RV, Cobon G, Tennent J, Zakrzewski H, Gale K, Wood PR, Scheerlinck JP, Willadsen P. Bm86 antigen induces a protective immune response against *Boophilus microplus* following DNA and protein vaccination in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 71: 151-60.
- de Vos S, Zeinstra L, Taoufik O, Willadsen P, Jongejan F. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from

- Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Exp Appl Acarol* 2001; 25:245-61.
- Drew DR, Lightowlers M, Strugnell RA. Vaccination with plasmid DNA expressing antigen from genomic or cDNA gene forms induces equivalent humoral immune responses. *Vaccine* 1999; 18: 692-702.
- Elad D, Segal E. Immunogenicity in calves of a crude ribosomal fraction of *Trichophyton verrucosum*: a field trial. *Vaccine* 1995; 13:83-7.
- 10 Estrada-Peña A, Jongejan F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Exp Appl Acarol* 1999; 23: 685-715.
- Garcia-Garcia JC, Gonzalez IL, Gonzalez DM, Valdes M, Mendez L, Lamberti J, D'Agostino B, Citroni D, Fragoso H, Ortiz M, Rodriguez M, de la Fuente J. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol* 1999; 23:883-95.
- 15
- 20 Kofta W, Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Vet Parasitol* 2001; 100:3-12.
- 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.
- 25

- Liyou N, Hamilton S, McKenna R, Elvin C, Willadsen P.  
Localization and functional studies on the 5'-  
nucleotidase of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp*  
*Appl Acarol* 2000; 24: 235-46.
- 5 Manoutcharian K, Terrazas LI, Gevorkian G, Govezensky T.  
Protection against murine cysticercosis using cDNA  
expression library immunization. *Immunol Lett* 1998; 62:  
131-6.
- Melby PC, Ogden GB, Flores HA, Zhao W, Geldmacher C, Biediger  
10 NM, Ahuja SK, Uranga J, Melendez M. Identification of  
vaccine candidates for experimental visceral  
leishmaniasis by immunization with sequential fractions  
of a cDNA expression library. *Infect Immun* 2000; 68:  
5595-602.
- 15 Moore RJ, Lenghaus C, Sheedy SA, Doran TJ. Improved vectors  
for expression library immunization--application to  
*Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Vaccine*  
2001; 20:115-20.
- Mulenga A, Sugimoto C, Onuma M. Issues in tick vaccine  
20 development: identification and characterization of  
potential candidate vaccine antigens. *Microbes Infect*  
2000; 2:1353-61.
- Munderloh UG, Wang YLM, Chen C, Kurtti TJ. Establishment,  
maintenance and description of cell lines from the tick  
25 *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.
- Parola P, Raoult D. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. Clin Microbiol Infect 2001; 7:80-3.
- Silva CL. The potential use of heat-shock proteins to vaccinate against mycobacterial infections. Microbes and Infection 1999; 1:429-35.
- Singh RA, Wu L, Barry MA. Generation of genome-wide CD8 T cell responses in HLA-A\*0201 transgenic mice by an HIV-1 ubiquitin expression library immunization vaccine. J Immunol 2002; 168: 379-91.
- Smooker PM, Setiady YY, Rainczuk A, Spithill TW. Expression library immunization protects mice against a challenge with virulent rodent malaria. Vaccine 2000; 18: 2533-40.
- van Drunen Littel-van den Hurk S, Loehr BI, Babiuk LA. Immunization of livestock with DNA vaccines: current studies and future prospects. Vaccine 2001; 19:2474-9.
- Wikel SK, Ramachandra RN, Bergman DK, Burkot TR, Piesman J. Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. Infect Immun 1997; 65:335-8.
- Willadsen P. Novel vaccines for ectoparasites. Vet Parasitol 1997; 71:209-22.
- Willadsen P, Jongejan F. Immunology of the tick-host

interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. Parasitol Today 1999; 15:258-62.

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

| Grupo experi-mental <sup>a</sup>                              | Número de acumulaciones clasificadas (Números de clones) | Número promedio $\pm$ SD de larvas unidas por ratón <sup>b</sup> | Número promedio $\pm$ SD de larvas engordadas por ratón <sup>b</sup> | Inhibición promedio $\pm$ SD de infestación de garrapatas (I) <sup>d</sup> | Número de acumulaciones seleccionadas para la clasificación secundaria |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Experimento 1                                                 | 33 (1383)                                                | 50 $\pm$ 13 (33-80)                                              | 9 $\pm$ 3 (2-42)                                                     | 39 $\pm$ 55% (-183 - 87%)                                                  | 6 (I>75%)                                                              |
| Controles inmunizados con DNA de vector para el experimento 1 | ---                                                      | 56 $\pm$ 13 (45-67)                                              | 16 $\pm$ 4 (5-27)                                                    | ---                                                                        | ---                                                                    |
| Experimento 2                                                 | 33 (1322)                                                | 56 $\pm$ 15 (29-79)                                              | 13 $\pm$ 4 (1-27)                                                    | 27 $\pm$ 28% (-53 - 89%)                                                   | 3 (I>60%)                                                              |
| Controles                                                     | ---                                                      | 54 $\pm$ 18 (36-73)                                              | 17 $\pm$ 3 (6-28)                                                    | ---                                                                        | ---                                                                    |

278  
888

|                                                                       |  |  |  |  |  |
|-----------------------------------------------------------------------|--|--|--|--|--|
| inmunizados<br>con el DNA<br>de vector<br>para el<br>experimento<br>2 |  |  |  |  |  |
|-----------------------------------------------------------------------|--|--|--|--|--|

\*Noventa 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.

<sup>b</sup>Quince 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.

<sup>c</sup>Las larvas engordadas que caen de cada ratón se recolectaron diariamente y se contaron después de 7 días.

<sup>d</sup>La inhibición de la infestación de garrapatas (I) para cada grupo de prueba se calculó con respecto a los controles

inmunizados con vector como  $[1 - (RL_n/RL_c \times RL_i/RL_{in})] \times 100$ , 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,  $RL_i$  es el número promedio de larvas unidas por ratón para el grupo de control, y  $RL_{in}$  es el número promedio de larvas unidas por ratón para cada grupo de prueba.

Tabla 2. Clasificación de los clones en 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 <sup>a</sup>                    | 2                |
|    | Catabolismo                                  | 4                |
| 15 | Adhesión celular                             | 2                |
|    | Ciclo de la célula <sup>a</sup>              | 2                |
|    | Citoesquelética <sup>a</sup>                 | 8                |
|    | Defensa                                      | 2                |
|    | Estructura de DNA o replicación <sup>a</sup> | 3                |
| 20 | Matriz Extracelular                          | 3                |
|    | Endocitosis                                  | 2                |
|    | Metabolismo de energía                       | 10               |
|    | Homeostasis                                  | 2                |
|    | Morfogenética                                | 9                |
| 25 | Mitocóndrica <sup>a</sup>                    | 34               |

280 281

|   |                                                      |     |
|---|------------------------------------------------------|-----|
|   | Síntesis de proteína o procesamiento <sup>a, b</sup> | 34  |
|   | Síntesis de RNA o procesamiento <sup>a</sup>         | 7   |
|   | Proteínas de choque térmico                          | 4   |
|   | Transducción de señal                                | 16  |
| 5 | Transporte                                           | 8   |
|   | No conocida                                          | 199 |
|   | Total                                                | 351 |

<sup>a</sup>Eliminada de la clasificación adicional de antígenos protectores. Otros clones se eliminaron por contener  
10 secuencias similares.

<sup>b</sup>Excepto para proteínas ribosomales.

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

15

| Sub-acumulación (No. de clones) | Clon                                                                                                    | Acumulación <sup>a</sup>                |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Ribosomal (17)                  | 1A2, 1A10, 1C11<br>1F6<br>2B8<br>2F8, 2F10<br>3A10, 2C3, 3D2, 3D10<br>3G9, 3G10<br>4D11, 4D12, 4E7, 4F7 | A5<br>D1<br>A10<br>E8<br>B4<br>E3<br>F1 |
| Proteína de membrana (7)        | 1D8, 1D11, 1E10<br>2B12<br>2H5<br>3C9<br>3G11                                                           | D1<br>A10<br>E8<br>B4<br>E3             |
| ATPasa (6)                      | 1A9, 1B2, 1C9<br>2C9<br>4A4                                                                             | A5<br>A10<br>C3                         |

|                                       |            |     |
|---------------------------------------|------------|-----|
|                                       | 4G12       | F1  |
| Canal de célula/Transportador (5)     | 1F4        | D1  |
|                                       | 2H11       | E8  |
|                                       | 4A12       | C3  |
|                                       | 4G10, 4G11 | F1  |
|                                       |            |     |
| Desarrollo temprano -específico (4)   | 1C8        | A5  |
|                                       | 3F4        | E3  |
|                                       | 4C7        | C3  |
|                                       | 4G9        | F1  |
| Receptor acoplado a la proteína G (4) | 2B7, 2C12  | A10 |
|                                       | 2F12       | E8  |
|                                       | 4C9        | C3  |
| Receptor de factor de crecimiento (3) | 2E8        | B5  |
|                                       | 3B8, 3C8   | B4  |
| Lectina (3)                           | 3E10       | E3  |
|                                       | 4B8, 4C8   | C3  |
| Vitelogenina (3)                      | 1F12       | D1  |
|                                       | 4A6        | C3  |
|                                       | 4G2        | F1  |
| Choque térmico (3)                    | 1C10       | A5  |
|                                       | 1F10       | D1  |
|                                       | 3F6        | E3  |
| EGF-similar (2)                       | 2H4        | E8  |
|                                       | 4C10       | C3  |
| Proteína secretada (2)                | 2F9        | E8  |
|                                       | 3C12       | 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 | Proteína Predicha | Inhibición de | Inhibi -ción | Eficac ia |
|---------|-------------------|---------------|--------------|-----------|
|---------|-------------------|---------------|--------------|-----------|

| cDNA                |                                         | infestación de garrapatas I (%) | de la muda |          |
|---------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|------------|----------|
|                     |                                         |                                 | M (%)      | 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                 | β-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,<br>1B2,<br>4A4 | ATPasa                                  | -57***                          | ND         | ND       |

283

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, anticoagulantes y otras proteínas con baja antigenicidad y  
10 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.

15 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 <sup>a</sup>             | Tamaño de la banda de cDNA <sup>b</sup> | Tamaño de la banda de DNA <sup>c</sup> |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| 4F8  | 4F8R5:<br>GCGTCGTGTGGAGCATCAGCGAC<br>(SEQ ID NO: 32)<br>4F8-R:<br>TCGCAACGGACAACGGCAGGTTG | 94°C, 30 seg<br>61°C, 30 seg<br>68°C, 2 min | 972 bp                                  | >1,600 bp                              |

|     |                                                                                                               |                                                   |        |              |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------|--------------|
|     | (SEQ ID NO: 33)                                                                                               |                                                   |        |              |
| 4D8 | 4D8R5:<br>GCTTGCGCAACATTAAAGCGAAC<br>(SEQ ID NO: 34)<br>4D8-R:<br>TGCTTGTTTGCAGATGCCCCATCA<br>(SEQ ID NO: 35) | 94°C, 30<br>seg<br>56°C, 30<br>seg<br>68°C, 1 min | 577 bp | >1,600<br>bp |
| 4E6 | 4E6R5:<br>GAAATATCTGTGAAACCAAGGCC<br>(SEQ ID NO: 36)<br>4E6U-R:<br>ATTGCACAACACATCATTAAGTG<br>(SEQ ID NO: 37) | 94°C, 30<br>seg<br>52°C, 30<br>seg<br>68°C, 1 min | 138 bp | ~1,600<br>bp |

\*Las condiciones de PCR son indicadas por las etapas de desnaturalización, recocido y polimerización, respectivamente.

<sup>b</sup>Calculado de la secuencia del inserto de cDNA.

5 <sup>c</sup>Estimado de la PCR del DNA genómico de IDE8.

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

|      |                      |    |    |    |    |    |    |
|------|----------------------|----|----|----|----|----|----|
| Fuen | <i>I. scapularis</i> | I. | I. | A. | D. | R. | B. |
|------|----------------------|----|----|----|----|----|----|

|      |                   |   |   |   |   |       |       |       |            |          |          |           |
|------|-------------------|---|---|---|---|-------|-------|-------|------------|----------|----------|-----------|
| -te  | I                 | H | l | N | I | Gland | peci- | rici- | americanus | variaba- | Sanguis- | microplus |
| de   | D                 | u |   | i | n | -ulas | ficus | nus   |            | lis      | neus     |           |
| RNA  | E                 | e | a | n | t | Sali- |       |       |            |          |          |           |
|      | S                 | v |   | f | e | vales |       |       |            |          |          |           |
|      |                   | e | r | a | s |       |       |       |            |          |          |           |
|      |                   | c |   | s | t |       |       |       |            |          |          |           |
|      |                   | i | v |   | i |       |       |       |            |          |          |           |
|      |                   | l |   |   | n |       |       |       |            |          |          |           |
|      |                   | l | a |   | o |       |       |       |            |          |          |           |
|      |                   | o |   |   | s |       |       |       |            |          |          |           |
|      | s                 | e |   |   |   |       |       |       |            |          |          |           |
| Clon | Expresión de mRNA |   |   |   |   |       |       |       |            |          |          |           |
| 4F8  | +                 | + | + | + | + | +     | -     | +     | -          | -        | -        | -         |
| 4D8  | +                 | + | + | + | + | +     | +     | +     | +          | +        | +        | +         |
| 4E6  | +                 | + | + | + | + | +     | +     | +     | +          | -        | -        | -         |

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*.

5 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 | Inhibición de la infestación ninfal de | Reducción en el peso de ninfas engordadas |
|-------------|----------------------------------------|-------------------------------------------|

| garrapatas       | garrapatas (%) <sup>a</sup> |     |     |     | (% ) <sup>b</sup> |     |     |     |
|------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|-------------------|-----|-----|-----|
|                  | 4D8                         | 4F8 | 4E6 | All | 4D8               | 4F8 | 4E6 | All |
| I.<br>scapularis | 35                          | 39  | 0   | 63  | 0                 | 0   | 0   | 0   |
| D.<br>variabilis | 22                          | 0   | 5   | 8   | 32                | 0   | 27  | 0   |
| A.<br>americanum | 17                          | 9   | 36  | 12  | 3                 | 1   | 0   | 16  |

<sup>a</sup>Determinado con respecto al número de ninfas engordadas recuperadas del grupo de control como es descrito en lo anterior para infestaciones larvales de garrapatas.

<sup>b</sup>Peso promedio por ninfa engordada con respecto al peso de 5 ninfas recolectadas del grupo de control.

25

20

15

10

5

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><br>1 | <i>Hy. m</i><br>2 | <i>R. s</i> | <i>L. r</i> | <i>R. m</i><br>S. Luisa | <i>R. m</i><br>Copich | <i>R. m</i><br>Muñoz | <i>R. m</i><br>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>R. microplus</i> S. Luisa    | 60          | 78          | 85          | 86                | 86                | 90          | 64          | 100                     | 100                   | 100                  | 99                         | 80          | 80          | 68          |
| <i>R. microplus</i> Copich      | 60          | 78          | 85          | 86                | 86                | 90          | 64          | 100                     | 100                   | 99                   | 99                         | 80          | 80          | 68          |
| <i>R. microplus</i> Muñoz       | 60          | 78          | 85          | 86                | 86                | 90          | 64          | 100                     | 100                   | 100                  | 99                         | 80          | 80          | 68          |
| <i>R. 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. punctatus</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, Informax, North Bethesda, MD, USA). Los valores para las comparaciones de secuencia de la cepa *R. microplus* están contenidos dentro del área cuadrada

52

98

[0068] 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.

**LO QUE SE REIVINDICA ES:**

1. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 60% homóloga a por lo menos una de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 39; o SEQ ID NOS. 52 hasta 62.
- 5 2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
3. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27.
- 10 4. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.
5. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31.
6. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39.
- 15 7. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52.
8. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53.
- 20 9. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 54.
10. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 55.
11. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56.
- 25 12. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 57.
13. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58.
14. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59.
- 30 15. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60.
16. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61.
- 35 17. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62.
18. Una composición de vacuna anti-garrapata

multiespecies que comprende un polipéptido de la reivindicación 1 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

- 5 19. Un método para inducir una respuesta inmune en un mamífero contra la infestación de garrapatas multiespecies y sus patógenos asociados, que comprende administrar al mamífero la vacuna de la reivindicación 18.

**EXTRACTO DE LA DESCRIPCION**

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.

10 W #322540 v1

**REPUBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

292

Folio 294

2020  
Bogotá D.C.,

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

|            |                         |
|------------|-------------------------|
| REFERENCIA | Radicación No. 06 77106 |
|            | Trámite 2               |
|            | Evento 1                |
|            | Actuación 416           |
|            | Oficio No. 3247         |
|            | Folios 1                |

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Siendo manifestación expresa del interesado de efectuar la publicación "inmediato", está se realizará en la próxima gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase  
Dado en Bogotá DC,

25 JUN 2007

ALIX CARMENZA GÓSPEDES DE VERGEL  
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpa10