



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-105202- -00000-0000

Fecha: 2013-04-25 11:25:23

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 60

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ COMPOSICION VACUNAL PARA EL CONTROL

DE LAS INFESTACIONES POR ECTOPARASITOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

DOMICILIO _____ LA HABANA, CUBA

74. APODERADO _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

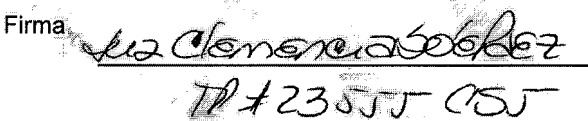
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-105202- -00000-0000 Fecha: 2013-04-25 11:25:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASC Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 60
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/CU2011/000005	Fecha 2011/09/26
Publicación Internacional No.		WO 2012/041260 A1	Fecha 2012/04/05
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
COMPOSICION VACUNAL PARA EL CONTROL DE LAS INFESTACIONES POR ECTOPARÁSITOS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A61K 039/000, C07K 014/435			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana 10600, Cuba	
CIUDAD		La Habana	
DEPARTAMENTO/ESTADO		Cuba	
PAÍS DE RESIDENCIA		Cuba	
No. TELÉFONO		3 47 36 11	
CORREO ELECTRÓNICO		clientes@cavelier.com	
NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN		Cuba	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. RODRIGUEZ MALLON		Alina	Cubana
2. FERNANDEZ DIAZ		Erlinda	Cubana
3 ESTRADA GARCIA		Mario Pablo	Cubano
4. CARPIO GONZALEZ		Yamila	Cubana
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Cuba		La Habana	Calle 186 No. 3115 entre 31 y 33, Apto. 12B, Playa, La Habana 11600
2. Cuba		La Habana	Amistad No. 363 Apto. 4, entre San José y Barcelona, Centro Habana, La Habana 10200,
3. Cuba		La Habana	Calle 186 No. 3112 entre 31 y 33, Apto. 10, Playa, La Habana 10600
4. Cuba		La Habana	Calle 8 No. 666 e/ 27 y Zapata, Apto. 1, Plaza de la Revolución, La Habana 10400,

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S) INVENTOR(ES))			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS De Páez		NOMBRES Luz Clemencia	IDENTIFICACIÓN C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35		No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA		CORREO ELECTRÓNICO cavelier@cavelier.com
PAÍS	COLOMBIA		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN CUBA		CÓDIGO PAÍS CU	(31) NÚMERO 2010-0188
(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 2010/09/28			
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. <u>13-0038045</u> No. <u>13-0038428</u>	Fecha: <u>2013/04/23</u> Fecha: <u>2013/04/24</u>
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma 	
C.C 35.456.344 de Usaquen		Tarjeta Profesional 23.555	

17	ANEXOS
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 33 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 14 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 7 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poder de CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA 10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. (Declaración de Acuerdo con la Regla 4.17 del PCT) 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$500.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por 4 reivindicaciones adicionales a 10 por \$120.000.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
5 de abril de 2012 (05.04.2012)

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/041260 A1

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/00 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2011/000005
- (22) Fecha de presentación internacional:
26 de septiembre de 2011 (26.09.2011)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
2010-0188
28 de septiembre de 2010 (28.09.2010) CU
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA [CU/CU]; Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana 10600 (CU).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
RODRIGUEZ MALLON, Alina [CU/CU]; Calle 186 No. 3115 Apto.12B entre 31 y 33, Playa, La Habana 10600 (CU). FERNANDEZ DIAZ, Erlinda [CU/CU]; Amistad No.363 Apto.4 entre San José y Barcelona, Centro Habana, La Habana 10200 (CU). ESTRADA GARCIA, Mario, Pablo [CU/CU]; Calle 186 No.3112 Apto.10, entre 31 y 33, Playa, La Habana 10600 (CU). CARPIO GONZALEZ, Yamila [CU/CU]; Calle 8 No.666 Apto.1 entre 27 y Zapata, PLaza de la Revolución, La Habana 10400 (CU).
- (74) Mandatario: XVAZQUEZ CASTILLO, Mariela; Departamento de Patentes, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, La Habana 10600 (CU).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE,

AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- sobre la identidad del inventor (Regla 4.17(i))
- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))
- sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: VACCINE COMPOSITION FOR CONTROLLING ECTOPARASITE INFESTATIONS

(54) Título : COMPOSICION VACUNAL PARA EL CONTROL DE LAS INFESTACIONES POR ECTOPARASITOS.

(57) Abstract: The present invention relates to the use of a peptide of PO ribosomal protein in the manufacture of a vaccine composition to control ectoparasite infestations and the transmission of their associated pathogens. This peptide is located between 267 and 301 amino acids of the PO protein, and can be obtained by recombinant means or by chemical synthesis. This peptide can be fused to a carrier protein or peptide, or an immuno - carrier and be included in an oily formulation. The formulations comprising the peptide vaccine confer protection against ticks and ectoparasites known as "sea lice" without generating autoimmunity in the host organism. Among these ticks may be mentioned species as Rhipicephalus microplus, Rhipicephalus sanguineus and Ixodes scapularis, and between sea lice are those of the Caligus and Lepeophtheirus genera.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con el uso de un péptido de la proteína ribosomal PO en la fabricación de una composición vacunal para el control de las infestaciones por ectoparásitos y, por consiguiente, de la transmisión de sus patógenos asociados. Dicho péptido se localiza entre los aminoácidos 267 y 301 de la proteína PO, y puede ser obtenido por vía recombinante o mediante síntesis química. Dicho péptido puede ser fusionado a una proteína o péptido portador, o a un inmunopotenciador y ser incluido en una formulación oleosa. Las formulaciones vacunales que comprenden dicho péptido confieren protección contra las garrapatas y los ectoparásitos conocidos como "piojos de mar", sin que ocurra generación de autoinmunidad en el organismo hospedante. Entre dichas garrapatas se pueden mencionar las especies Rhipicephalus microplus, Rhipicephalus sanguineus e Ixodes scapularis, y entre los piojos de mar se encuentran aquellos de los géneros Caligus y Lepeophtheirus.

WO 2012/041260 A1

COMPOSICION VACUNAL PARA EL CONTROL DE LAS INFESTACIONES POR ECTOPARÁSITOS

Campo de la técnica

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la medicina veterinaria, en particular con el control de las infestaciones por ectoparásitos y de la transmisión de sus patógenos asociados. Dicho control se logra mediante el uso de un péptido de la proteína ribosomal P0 en la fabricación de composiciones vacunales. Las formulaciones vacunales que comprenden dicho péptido confieren
10 protección sin que ocurra generación de autoinmunidad en el organismo hospedante.

Estado de la técnica anterior

Los ectoparásitos hematófagos terrestres tales como mosquitos, pulgas y garrapatas constituyen vectores para la transmisión de agentes infecciosos
15 causantes de enfermedades. Algunas de estas enfermedades afectan directamente al ser humano y/o a sus animales afectivos, mientras que otras son causantes de grandes pérdidas económicas en la esfera agropecuaria. Ejemplos de enfermedades que son transmitidas por ectoparásitos lo constituyen la malaria, la leishmaniasis, el dengue, la erliquiosis y la enfermedad de Lyme. Las garrapatas
20 son consideradas los segundos transmisores de enfermedades a los humanos, luego de los mosquitos (Parola P. y Raoult D.; Clin. Microbiol. Infect. 2001, 7: 80-83). Las infecciones hemoparasitarias transmitidas por garrapatas causan pérdidas anuales en el orden de billones de dólares estadounidenses dentro de la industria ganadera, afectando fundamentalmente la producción bovina en las áreas
25 tropicales y subtropicales. Dentro de las enfermedades de mayor relevancia en este sentido se encuentran la anaplasmosis, la babesiosis, la Enfermedad de Lyme (producida por *Borrelia burgdorferi*) y la llamada Fiebre de la Costa Este (producida por *Theileria parva*).

Los ectoparásitos conocidos como piojos de mar (Copepoda, Caligidae)
30 constituyen el patógeno marino más expandido en los últimos 30 años en la industria salmonera, extendiéndose en los últimos 15 años a otras especies de peces en cultivo y a las poblaciones salvajes de salmónidos (Pike, A.W. y Wadsworth, S.L. Advances in Parasitology 2000, 44:233-337, Ragias, V. et al.

- Aquaculture 2004, 242: 727-733). Las mayores pérdidas económicas son ocasionadas por los organismos de los géneros *Caligus* y *Lepeophtheirus*. Los llamados piojos de mar pueden causar cambios fisiológicos en sus huéspedes, que incluyen el desarrollo de una respuesta de *stress*, la reducción de las funciones inmunes, fallo en la osmorregulación y la muerte, si no se trata la infección (Johnson, S.C., *et al.* Zool Studies 2004, 43: 8-19). Existen además algunas evidencias que sugieren que los piojos de mar podrían constituir vectores para la transmisión de infecciones producidas por virus y bacterias a los peces (Barker, E.D., *et al.* Parasitology Research 2009, 105: 1173-1177).
- 10 Una amplia variedad de agentes químicos y fármacos han sido utilizados para controlar las infestaciones producidas por garrapatas y piojos de mar. El uso de pesticidas químicos como amidinas, organofosforados, el peróxido de hidrógeno y otros constituye en la actualidad la medida fundamental para el control de estos ectoparásitos. No obstante, el uso intensivo de estos tiene como inconvenientes la
- 15 contaminación de los alimentos (peces, carne y leche) con residuos químicos, la afectación medioambiental y el desarrollo de resistencia por parte de los ectoparásitos (Shahein Y. E. Vet. Immunol. and Immunopathol. 2008, 121: 281-289, Denholm, I. Pest Manag Sci 2002, 58: 528-536; Bravo, S. *et al.* Aquaculture 2008, 282: 7-12; Lees *et al.* J. Fish Dis. 2008, 31: 947-951).
- 20 La vacunación se considera una alternativa promisorio para el control de las infestaciones por ectoparásitos desde el punto de vista de su eficacia, seguridad ambiental y sostenibilidad económica. La factibilidad del uso de antígenos producidos por técnicas de ácido dextrirribonucleico (ADN) recombinante con este propósito se ha demostrado con las vacunas comerciales contra la garrapata
- 25 *Rhipicephalus microplus*, basadas en la proteína Bm86 recombinante (TickGARD, de Hoechst Animal Health, Australia; y GAVAC, comercializada por Heber Biotec, Cuba). Ésta última ha resultado efectiva en estudios de campo cuando su aplicación se encuentra incluida dentro de un programa de control integrado. En el caso del piojo de mar existen algunos avances en el uso de proteínas como
- 30 candidatos vacunales, como es el caso akirin-2 de *Caligus rogercresseyi*, al que se denominó my32, y la realización de ensayos de reto con resultados promisorios (Solicitud de Patente WO2008/145074 "Secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos, y vacuna para el control de infestaciones por ectoparásitos en peces").

La identificación de nuevos antígenos protectivos constituye la etapa limitante para incrementar la eficacia de estas vacunas. Aunque nuevas proteínas de garrapatas se han identificado recientemente, y se han propuesto como posibles moléculas protectivas, solo un número limitado de ellas se han evaluado como antígenos producidos por vía recombinante en ensayos de vacunación. En el caso de los piojos de mar, que son ectoparásitos que se alimentan del mucus, la piel y la sangre del huésped y, por tanto, tienen sólo un contacto limitado con el sistema inmune del mismo (Boxaspen, K. ICES Journal of Marine Science 2006, 63: 1304-1316), se han investigado, como candidatos vacunales, proteínas inmunomoduladoras del parásito que suprimen la respuesta inmune del huésped en el sitio de adhesión y alimentación (Wikel, S. K. et al., "Arthropod modulation of host immune responses". En: The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod Relationships. Editors: Wikel, S. K., CAB Int., 1996, pp. 107-130). También se han estudiado otras moléculas semejantes a la vitelogenina y proteínas de adhesión al huésped (Johnson, S.C. et al. Zool Studies 2004, 43: 8-19; Boxaspen, K. ICES Journal of Marine Science 2006, 63: 1304-1316), pero debido al poco conocimiento de los mecanismos y la patología de la infestación de los salmones por el piojo de mar, la identificación de blancos para la prevención y el tratamiento de esta infestación no han sido exitosos. De todas formas, los resultados de las investigaciones realizadas en la evaluación de diferentes candidatos vacunales en ensayos de inmunización han demostrado que el uso combinado de varias moléculas, involucradas en diferentes procesos fisiológicos, constituye un método factible para controlar las infestaciones por ectoparásitos.

Los ribosomas eucarióticos están conformados por moléculas individuales de ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) y más de 80 proteínas organizadas dentro de las subunidades mayor y menor. La mayoría de las proteínas ribosomales son básicas (punto isoeléctrico (pI)>8,5), pero existe además un grupo de proteínas ácidas (pI=3,0-5,0) que forman una estructura similar a un tallo en la subunidad mayor del ribosoma. Estas proteínas ácidas se denominan proteínas P (P0, P1 y P2), debido a su capacidad de ser fosforiladas, lo cual desempeña un rol fundamental en la regulación de la actividad traduccional de los ribosomas (Wojda I. et al. Acta Bioch. Pol. 2002, 49: 947-957). Las proteínas P contienen una región C-terminal conservada, de aproximadamente 17 aminoácidos, cuyos últimos seis residuos se encuentran altamente conservados, lo cual constituye la base de la reactividad

inmunológica cruzada entre ellas y con las proteínas P de otras especies. La proteína P0 es fundamental para el ensamblaje de la subunidad ribosomal 60S, donde se une directamente a P1, P2, al ARNr 28S y al factor eEF2. Su ausencia conduce a la generación de ribosomas deficientes de la subunidad 60S, los cuales son inactivos para la síntesis de proteínas, conllevando a la muerte celular.

Las proteínas P son altamente inmunogénicas, y se han estudiado extensamente en humanos, debido a su asociación con enfermedades autoinmunes y con la carcinogénesis. Estas aplicaciones de las proteínas ribosomales se han protegido mediante patentes por sus respectivos autores. La proteína ribosomal P0, en particular, constituye un candidato vacunal prometedor contra varios protozoos y bacterias. La misma resultó inmunogénica como antígeno recombinante (ya sea empleando la proteína completa o la región C-terminal consistente en los últimos 11-16 aminoácidos) o mediante la inmunización con ADN desnudo, contra *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* (Zhang H. *et al.* Mol. Biochem. Parasitol 2007, 153: 141-148), *Trypanosoma cruzi* (Skeiky Y. A. *et al.* J. Immunol. 1993, 151: 5504-5515), *Leishmania infantum* (Iborra S. *et al.*; Infect. Immunol. 2003, 71: 6562-6572 y 2005, 72: 5515-5521) y varias especies de *Babesia* (Terkawi M. A. *et al.*; Vaccine 2007, 25: 2027-2035; Terkawi M. A. *et al.* Parasitol. Res. 2007, 102: 35-40) y *Plasmodium* (Chatterjee S. *et al.* Infect. Immunol. 2000, 68: 4312-4318; Rajeshwari K. *et al.* Infect. Immunol. 2004, 72: 5515-5521). La respuesta inmune obtenida en la mayoría de estos experimentos se caracterizó por la generación de altos títulos de anticuerpos específicos, capaces de conferir protección de manera activa y pasiva contra la infección, la activación de linfocitos T y la producción de interferón gamma (IFN γ) como parte de un patrón de respuesta del tipo Th1.

Su uso como inmunógeno contra varias bacterias y protozoos, sin el reporte de reacciones de naturaleza autoinmune en el hospedero se debió a la relativamente baja identidad de secuencia aminoacídica de esta proteína entre estos microorganismos y los mamíferos. El caso más llamativo lo constituyó la inmunización de ratones con un péptido consistente en los últimos 16 aminoácidos de la proteína ribosomal P0 de *Plasmodium falciparum* (Rajeshwari K. *et al.*; Infect. Immunol. 2004, 72: 5515-5521), el cual presenta una identidad del 68% con la región C-terminal de esta misma proteína en ratones. Sin embargo, el uso de esta proteína, o de la región C-terminal de la misma, como inmunógeno para el control de las infestaciones por garrapatas y piojos de mar se encuentra limitado por el

alto grado de identidad aminoacídica existente para este antígeno entre los ectoparásitos y sus organismos hospederos.

Experimentos realizados recientemente con ARN de interferencia específico para el silenciamiento de la expresión de esta proteína en la garrapata *Haemaphysalis*

5 *longicornis* mostraron una disminución considerable en la ganancia de peso de las garrapatas, y una mortalidad del 96%, provocada por afectaciones estructurales a nivel de glándula salival y cutícula; lo cual sugiere que la proteína ribosomal P0 es necesaria para la ingestión de sangre y la viabilidad de las garrapatas y,

posiblemente, de otros ectoparásitos (Gong H. *et al.* Vet. Parasitol. 2008, 151: 268-

10 278). No obstante, el desarrollo de un candidato vacunal basado en este antígeno tiene como inconvenientes el alto grado de identidad existente entre las secuencias reportadas de vertebrados y ectoparásitos como garrapatas y piojos de mar, la cual es superior en la región C-terminal de la proteína, lo que puede traer como consecuencia la inducción de tolerancia o la generación de una respuesta de

15 autoanticuerpos en el organismo hospedante.

El uso intensivo de agentes químicos y fármacos para controlar las infestaciones producidas por garrapatas y piojos de mar tiene como inconvenientes la contaminación de los alimentos con residuos químicos, la afectación medioambiental y el desarrollo de resistencia por parte de los ectoparásitos. Por

20 ello, la vacunación se considera una alternativa promisorio y existe la necesidad de identificar nuevos antígenos vacunales que sean capaces de conferir protección por sí solos o puedan ser incorporados a las vacunas existentes.

Explicación de la invención

25 La presente invención resuelve el problema antes mencionado al proveer una composición vacunal para el control de las infestaciones por ectoparásitos que comprende un péptido de la proteína ribosomal P0 de dichos ectoparásitos. Dicha composición comprende, como antígeno, una región inmunogénica de la proteína ribosomal P0 que es poco conservada entre los ectoparásitos y los organismos

30 afectados por los mismos, según los resultados de un estudio que se revela en esta invención, por primera vez. La región identificada dentro de la proteína ribosomal P0 está comprendida entre los aminoácidos 267 y 301 de la misma.

La presencia de la proteína P0 en todos los organismos, como un componente estructural de los ribosomas que es fundamental para la viabilidad celular,

constituye una ventaja para el uso de estas secuencias con el objetivo de obtener candidatos vacunales contra diferentes especies de ectoparásitos. Sin embargo, el uso de esta proteína, o de la región C-terminal de la misma, como inmunógeno para el control de las infestaciones por garrapatas y piojos de mar se encuentra limitado por el alto grado de identidad aminoacídica existente para este antígeno entre los ectoparásitos y sus organismos hospederos.

En esta invención se logra evadir esta situación, por primera vez, al identificar regiones altamente inmunogénicas dentro de la proteína, que coinciden con zonas de baja similitud de secuencia entre estos grupos de organismos. Mediante predicciones bioinformáticas, se comprobó que esta región coincide con una zona de baja hidrofobicidad y de alto grado de accesibilidad de la proteína, que la convierte en una secuencia aminoacídica con altas probabilidades de encontrarse expuesta.

A partir de ARN total de larvas de las garrapatas *Rhipicephalus microplus* y *R. sanguineus*, y de piojos de mar adultos de la especie *Caligus rogercresseyi* se generaron ADNs complementarios mediante reverso-transcripción. Las secuencias nucleotídicas que codifican para la proteína ribosomal P0 de estas garrapatas (SEQ ID NO. 1 y SEQ NO. 2) y de este piojo de mar se amplificaron mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*, abreviado PCR.), a partir de estos ADNs complementarios y oligonucleótidos específicos.

Las secuencias polipeptídicas correspondientes a las proteínas P0 de los ectoparásitos *R. sanguineus* y *R. microplus* fueron idénticas entre ellas, y se designaron como SEQ ID NO. 3. Esta secuencia y la de la P0 de *C. rogercresseyi* presentaron una identidad de secuencia mayor del 70% con la P0 de sus organismos hospedantes, siendo aún mayor para los últimos 16 aminoácidos que componen la región C-terminal, descrita como la zona más inmunogénica dentro de la proteína. La zona de menor similitud en la secuencia aminoacídica, que a la vez tiene posibilidades de resultar expuesta y de ser inmunogénica, se detectó en todos los casos en la región comprendida entre los aminoácidos 267 y 301 (SEQ ID NO.4, péptido correspondiente en la proteína P0 de *Rhipicephalus microplus* [pP0]; SEQ ID NO.6, péptido correspondiente en la proteína P0 de *Ixodes scapularis* [pP0Is]; SEQ ID NO.8, péptido correspondiente en la proteína P0 de *Caligus clemensi* [pP0Cc], SEQ ID NO.9, péptido correspondiente en la proteína

P0 de *L. salmonis* [pP0Ls] y SEQ ID NO.10, péptido correspondiente en la proteína P0 de *C. rogercresseyi* [pP0Cr]).

Por tanto, en una realización de la invención, la composición vacunal comprende un péptido con una secuencia aminoacídica identificada como SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9 o SEQ ID NO. 10, un fragmento de dichas secuencias, o un péptido o polipéptido que exhibe al menos una identidad del 70 % con dichas secuencias.

La presente invención está relacionada también con aquellas composiciones vacunales donde el péptido de P0 indicado se fusiona, se conjuga o se co-administra con otra molécula, para incrementar su inmunogenicidad o potenciar su efecto protector. Entre dichas moléculas se encuentran proteínas portadoras e inmunopotenciadores. En una materialización de la invención, dicha molécula se selecciona dentro del grupo compuesto por la hemocianina, los epitopos de células T, las proteínas que forman partículas semejantes a virus, la proteína Bm86 de la garrapata *R. microplus*, la proteína Rs86 de la garrapata *R. sanguineus* y la proteína my32 del piojo de mar *C. rogercresseyi* o *L. salmonis*.

Los péptidos identificados como SEQ ID NO. 4, 6, 9 y 10, de entre 35 y 36 aminoácidos, y fragmentos de estos de 20 aminoácidos, se obtuvieron mediante síntesis química y se conjugaron a la hemocianina (del inglés *Keyhole Limpet Hemocyanin*, abreviado KLH) de *Megathura crenulata*, para potenciar su inmunogenicidad. Con los conjugados se realizaron experimentos de inmunización, con reto en condiciones controladas, para evaluar sus capacidades protectoras. El péptido pP0 (SEQ ID NO. 4) se ensayó contra *R. sanguineus* y *R. microplus* en conejos y bovinos, respectivamente, el pP0Ls (SEQ ID NO. 6) se evaluó contra *I. scapularis* en conejos. Por su parte, los péptidos pP0Ls y pP0Cr (SEQ ID NO. 9 y SEQ ID NO.10, respectivamente) se evaluaron contra *L. salmonis* y *C. rogercresseyi*, respectivamente, ambos en *Salmo salar*.

La inmunización de conejos y bovinos con la formulación vacunal que contiene el conjugado proteico (pP0-KLH) y el adyuvante Montanide 888 fue capaz de inducir en ambos casos una potente respuesta inmune humoral específica contra el péptido. No se observaron indicios de la ocurrencia de una respuesta de naturaleza autoinmune en los animales de experimentación utilizados, que fuese provocada por el reconocimiento y la reactividad de la proteína P0 de estos mamíferos por parte de los anticuerpos generados contra el péptido pP0. Esto se

confirmó mediante un ensayo de reactividad cruzada "*in vitro*" en la línea celular de riñón de conejo RK-13, empleando un suero hiperinmune contra el péptido obtenido en ratones. La vacunación con el conjugado pP0-KLH indujo protección contra las infestaciones por *R. sanguineus* y *R. microplus*, provocando 5 afectaciones estructurales y de los parámetros biológicos en ambas especies de garrapatas. Además, se obtuvieron resultados similares contra la garrapata *I. scapularis* luego de la inmunización con el péptido sintético de la proteína P0 de esta garrapata (pP0Is) conjugado a hemocianina.

La vacunación de salmones con los conjugados pP0Ls-KLH y pP0Cr-KLH indujo 10 protección contra las infestaciones por ambas especies de piojos de mar, evidenciado en una disminución significativa del número de parásitos por pez. Se realizaron, además, experimentos de inmunización con el pP0 y el pP0Cr obtenidos por vía recombinante, fusionados a los epitopos T de la toxina tetánica y de la proteína de fusión del virus del sarampión (del inglés *Measles Virus Fusion protein*, abreviado MVF) en una misma construcción genética. Como resultado de 15 los experimentos de inmunización con estos antígenos quiméricos, para el caso del piojo de mar, se obtuvo que la fusión a los epitopos T promiscuos mejora significativamente la protección, en comparación con el antígeno conjugado a KLH. El pP0 se fusionó también a partículas semejantes a virus (del inglés *Virus-like Particles*, abreviado VLPs) del Virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo (del inglés *Rabbit Hemorrhagic Disease Virus*, abreviado RHDV), y se comprobó además que cuando el péptido se fusiona al antígeno Bm86, el efecto protector 20 del péptido se potencia. Esto pudiera deberse al efecto combinado de los anticuerpos producidos contra ambos inmunógenos, y/o al hecho de que el daño estructural provocado por los anticuerpos dirigidos contra el antígeno Bm86, a nivel del intestino de las garrapatas, favorezca la acción de los anticuerpos específicos contra el péptido de la proteína ribosomal P0. Por su parte, el pP0Cr se fusionó a la proteína my32 en otra construcción genética, y en este caso se obtuvieron los efectos más relevantes en los daños a *C. rogercresseyi*, presumiblemente por la 25 potenciación del efecto específico individual de los dos antígenos.

De esta forma, en la invención se demostró que las composiciones vacunales basadas en el péptido pP0 son efectivas para el control de las infestaciones por ectoparásitos, como las garrapatas y los piojos de mar. Por ello, las composiciones 30

basadas en pP0 son útiles también para el control de la transmisión de los patógenos asociados a dichos ectoparásitos.

Esta vacuna comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de antígeno en un adyuvante farmacéuticamente aceptable, mediante la cual se pueden controlar

5 las infestaciones por estos patógenos. Como ya se expresó el antígeno en esta

vacuna consiste en un péptido de la proteína ribosomal P0 de estos ectoparásitos,

comprendido entre los aminoácidos 267 y 301 de dicha proteína, que se

corresponde con la zona de menor similitud en la secuencia aminoacídica de la

proteína de los ectoparásitos con la misma región de la proteína en sus

10 respectivos organismos hospedantes. Dicho péptido se obtiene por vía

recombinante o por síntesis química. También se pueden obtener por vía

recombinante los polipéptidos fusionados que comprenden al péptido pP0. Como

es conocido por los versados en este campo de la técnica, para la obtención de

dichos antígenos por vía recombinante, se puede emplear un sistema de expresión

15 en levaduras, bacterias, plantas, larvas de insectos, células de insectos o células

de mamíferos.

En una realización de la invención, las composiciones vacunales de la misma

pueden comprender, adicionalmente, un adyuvante vacunal. En el contexto de la

invención, se evaluaron formulaciones vacunales que comprenden un adyuvante

20 de tipo oleoso. Sin embargo, como adyuvantes pueden emplearse sales de

aluminio, vesículas liposomales, moléculas relacionadas con el sistema inmune

como las citoquinas, entre otros.

Las composiciones de la invención se pueden administrar de muy diversas formas.

En una realización de la invención, la composición se administra por inyección. En

25 otra realización, se administran mediante formulaciones de pienso. En el caso de

que las composiciones sean administradas a peces es posible aplicar las mismas

mediante baños de inmersión.

Es también objeto de la presente invención una composición vacunal para el

control de las infestaciones por ectoparásitos que comprende ácidos nucleicos que

30 codifican para el péptido de la proteína ribosomal P0 de dichos ectoparásitos,

correspondiente a la región entre los aminoácidos 267 y 301 de la proteína, y que

genera una respuesta inmune contra dicho péptido mediante inmunización con

ADN desnudo. En una materialización de la invención, dicho péptido tiene una

secuencia aminoacídica identificada como SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6, SEQ ID

NO. 8, SEQ ID NO. 9 o SEQ ID NO. 10, es un fragmento de dichas secuencias, o es un péptido o polipéptido que exhibe al menos una identidad del 70 % con dichas secuencias.

La invención, además, se relaciona con el uso de la región comprendida entre los aminoácidos 267 y 301 de la proteína ribosomal P0 de ectoparásitos para la fabricación de una composición vacunal para el control de las infestaciones por estos parásitos o la transmisión de los patógenos asociados a los mismos. En una materialización, dicho péptido tiene una secuencia aminoacídica identificada como SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9 o SEQ ID NO. 10, es un fragmento de dichas secuencias, o es un péptido o polipéptido que exhibe al menos una identidad del 70 % con dichas secuencias.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Predicción del grado de accesibilidad de los residuos aminoacídicos presentes en la proteína ribosomal P0 de *R. microplus* y *R. sanguineus*. La región correspondiente a la secuencia definida como SEQ ID NO.4 se encuentra señalada con un círculo.

Figura 2. Respuesta de anticuerpos IgG específicos anti-péptido P0, detectada por ELISA en el suero de ratones BALB/c inmunizados con el conjugado pP0-KLH. Los datos se expresan como el recíproco del título promedio de anticuerpos, determinado como la última dilución de suero con una media de densidad óptica (DO) mayor que el triple de la media de la DO de un suero negativo. Las desviaciones estándar se representan mediante barras de error en sentido positivo. No se detectaron títulos de anticuerpos para ninguno de los animales en el día cero.

Figura 3. Patrón de expresión de la proteína ribosomal P0 de garrapatas *Rhipicephalus* en la línea celular RK-13 de conejo analizada mediante *Western blotting* con el anticuerpo policlonal generado en ratones contra P0. 1. Patrón de peso molecular, 2. lisado de células RK-13 transfectadas con el plasmidio pAdTrack-P0Rs en condiciones reductoras, 3. lisado de células RK-13 transfectadas con el plasmidio pAdTrack-P0Rs en condiciones no reductoras, 4. Lisado de células RK-13 no transfectadas en condiciones reductoras, 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Dodecilosulfato de sodio

(SDS-PAGE) en condiciones reductoras del lisado de células RK-13 transfectadas con el plasmidio pAdTrack-P0Rs.

Figura 4. Respuesta de anticuerpos IgG anti-KLH, anti-péptido P0 y anti-Bm86 detectados por ELISA en el suero de conejos inmunizados con estos antígenos (Ejemplo 6). Los datos se expresan como el recíproco del título promedio de anticuerpos, determinado como la última dilución de suero con una media de DO mayor que el triple de la media de la DO de los grupos controles negativos según corresponda. Las desviaciones estándar se representan mediante barras de error en sentido positivo. No se detectaron títulos de anticuerpos específicos contra los antígenos para ninguno de los grupos en el día cero del ensayo.

Figura 5. Recuperación de larvas, ninfas y adultas de *R. sanguineus* en los conejos inmunizados del Ejemplo 6. Los datos se expresan como el promedio de los porcentos de larvas, ninfas y adultas recuperadas en los diferentes grupos experimentales. Las desviaciones estándar de los grupos se representan mediante barras de error en sentido positivo. En la gráfica se muestran con letras diferentes, las diferencias estadísticamente significativas existentes entre los grupos experimentales (ANOVA y prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni [$p < 0.01$]. Para el análisis, los datos en proporciones fueron previamente transformados al arcosen de su raíz cuadrada).

Figura 6. Ninfas recién mudadas de *R. sanguineus* a partir de las larvas alimentadas sobre los diferentes grupos experimentales del ejemplo 6. (A) Grupo control negativo (B) Inmunizados con Bm86 (C) Inmunizados con el conjugado pP0-KLH y (D) Apariencia de las ninfas muertas mudadas a partir de larvas alimentadas sobre los conejos inmunizados con el pP0-KLH.

Figura 7. Porciento de eclosión de los aoves de *R. sanguineus* a partir de teleoginas alimentadas sobre los conejos inmunizados en el Ejemplo 6. Los datos se expresan como el promedio por grupo. Las desviaciones estándar para cada grupo se representan mediante barras de error en sentido positivo. Las diferencias estadísticamente significativas se representan mediante un asterisco (ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni ($p < 0,05$)).

Figura 8. Respuesta de anticuerpos IgG anti-péptido P0 (A) y supervivencia de larvas, ninfas y adultas de *R. sanguineus* (B) correspondientes a los conejos

inmunizados con las variantes de este péptido fusionado a diferentes moléculas inmunopotenciadoras. Las desviaciones estándar se representan mediante barras de error en sentido positivo.

Figura 9. Análisis mediante *Western blotting* del patrón de expresión de la proteína quimérica Bm86-pP0 en el precipitado de ruptura de la cepa MP36 de *P. pastoris*, utilizando sueros hiperinmunes generados contra el péptido pP0 (A) y contra la proteína Bm86 (B). Para ambos casos, línea 1. Precipitado de ruptura en condiciones reductoras, 2. Precipitado de ruptura en condiciones no reductoras, 3. Proteína desglicosilada por digestión con la enzima PNGasa F.

Figura 10. Respuesta de anticuerpos IgG anti-péptido P0 y anti-Bm86, detectada por ELISA en el suero de bovinos inmunizados con estos antígenos de manera individual, combinada o con la proteína quimérica Bm86-pP0. Los datos se expresan como el recíproco del título promedio de anticuerpos, determinado como la última dilución de suero con una media de DO mayor que el triple de la media de la DO del grupo control negativo. Las desviaciones estándar se representan mediante barras de error en sentido positivo. No se detectaron títulos de anticuerpos para ninguno de los grupos al inicio del ensayo.

Figura 11. Promedio del peso de las teleoginas y del aove de *R. microplus* alimentadas en los bovinos inmunizados en el Ejemplo 8. En la gráfica se muestran las diferencias estadísticamente significativas existentes entre los grupos experimentales y de cada uno de ellos con respecto al grupo control negativo mediante letras diferentes (ANOVA y prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls [$p < 0.05$]).

Figura 12. Respuesta de anticuerpos IgG anti-pP0ls detectada por ELISA en el suero de conejos inmunizados con este antígeno y posteriormente retados con *I. scapularis*. Los datos se expresan como el recíproco del título promedio de anticuerpos, determinado como la última dilución de suero con una media de DO mayor que el triple de la media de la DO del grupo control negativo. Las desviaciones estándar se representan mediante barras de error en sentido positivo. No se detectaron títulos de anticuerpos para ninguno de los grupos en el día cero del ensayo.

Figura 13. Comportamiento de los parámetros biológicos de *I. scapularis* en los conejos inmunizados con el conjugado pP0ls-KLH. Se representan la viabilidad de las larvas y la recuperación de ninfas y adultas (A) y el porcentaje de eclosión de los aovos (B). Los datos se expresan como el promedio por grupo. Las desviaciones estándar se representan mediante barras de error en sentido positivo. En la gráfica se muestran con un asterisco las diferencias estadísticamente significativas existentes con respecto al grupo control negativo (ANOVA y prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni [$p < 0.05$]).

Ventajas de la solución propuesta:

En la presente invención se demuestra la capacidad protectora de una formulación vacunal, que contiene un péptido comprendido entre los aminoácidos 267 y 301 de la proteína ribosomal P0 de diferentes ectoparásitos, contra las garrapatas *R. microplus*, *R. sanguineus* e *I. scapularis*, y los ectoparásitos conocidos como piojos de mar *L. salmonis* y *C. rogercresseyi*, sin la ocurrencia de reacciones cruzadas con la proteína del organismo hospedante. En todas las inmunizaciones, el pP0 se administró conjugado o fusionado a una molécula inmunopotenciadora para mejorar la respuesta inmune de los animales. En el caso de las garrapatas, la aplicación de este péptido (o fragmentos del mismo) fusionado a la proteína Bm86 o combinado con ella, induce un mayor grado de afectación de la viabilidad, y de los parámetros biológicos de estos artrópodos, que el provocado por dichos antígenos cuando son utilizados individualmente. Por tanto, la aplicación de esta proteína quimérica o la combinación de ellas como parte de un programa de lucha integrada, pudiera resultar en un mayor control de las infestaciones por estas u otras especies de garrapatas, así como en la disminución de la incidencia de enfermedades hemoparasitarias transmitidas por las mismas. En el caso de los piojos de mar, la mayor afectación de los mismos fue observada cuando se fusionó el pP0Cr a los epítopes T promiscuos y a la proteína my32. El alto grado de conservación aminoacídica de dicho péptido entre la mayoría de las especies de artrópodos y piojos de mar, y la baja identidad de esta secuencia con el fragmento correspondiente de las proteínas de mamíferos y peces, convierten a este péptido de la proteína ribosomal P0 (o fragmentos del mismo) en un antígeno para el desarrollo de vacunas contra ectoparásitos.

Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos de realización

Ejemplo 1. Amplificación y clonaje de las secuencias nucleotídicas que codifican para la proteína ribosomal P0 de *R. microplus*, *R. sanguineus* y *C. rogercresseyi*.

Mediante reacciones de reverso-transcripción a partir de ARN total de larvas de *R. microplus* y *R. sanguineus* y adultos de *C. rogercresseyi* se obtuvieron ADNs complementarios. Las reacciones se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones descritas en el kit "Reverse Transcription System" (Promega, USA #A3500). A partir de los ADNs complementarios obtenidos se amplificaron mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) las secuencias de nucleótidos que codifican para la proteína ribosomal P0 de *R. microplus* y *R. sanguineus* (SEQ ID No. 1 y SEQ ID No. 2) y la secuencia de la P0 de *C. rogercresseyi*. Como cebadores para los PCRs de garrapatas se utilizaron oligonucleótidos sintéticos diseñados a partir de la secuencia nucleotídica reportada en el banco de genes Genbank, para la P0 de *Haemaphysalis longicornis* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) bajo el número de acceso EU048401:

Oligonucleótido "Forward": 5' ATGGTCAGGGAGGACAAGACCACCTGG 3'

Oligonucleótido "Reverse": 5' CTAGTCGAAGAGTCCGAAGCCCATGTGCG 3'

Como cebadores para la amplificación a partir de ADNc de *C. rogercresseyi* se utilizaron oligonucleótidos sintéticos degenerados diseñados a partir de las secuencias nucleotídicas reportadas en el banco de genes Genbank para la P0 de diferentes especies de garrapatas (*Haemaphysalis longicornis* e *Ixodes scapularis*) e insectos (*Drosophila melanogaster*, *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*):

Oligonucleótidos "Forward":

F1 5' ATGGGCAAGAACAC(C/G)ATGAT(C/G)CGCAA(G/A)GC 3'

F2 5' ATGG(T/G)(T/C)AGGGAG(G/A)ACAA(G/A)(A/G)C(C/A/T)(G/A)C(C/G)TGGAA 3'

Oligonucleótido "Reverse":

R1 5' TC(G/A)AA(A/C/G)AG(G/A/T)C(C/T)GAA(T/G/A)CCCAT(A/G)TC(A/G)TC 3'

Como resultado de las reacciones con ADN complementarios de garrapatas se obtuvo una banda de ADN de aproximadamente 957 pb en ambos casos, las

19
cuales se clonaron en el vector comercial pGEM-TEasy (Promega, USA) para su secuenciación. En el caso de la reacción de PCR a partir de ADN complementario de *C. rogercresseyi*, se obtuvo una banda de ADN de aproximadamente 780 pb para la combinación de oligonucleótidos F1-R1 y una banda de aproximadamente 960 pb para la combinación de oligonucleótidos F2-R1. En ambos casos, las bandas se clonaron en el vector comercial pGEM-TEasy (Promega, USA) para su secuenciación.

Ejemplo 2. Análisis bioinformático.

Los análisis de identidad de secuencias aminoacídicas se realizaron mediante el uso de los programas BlastX y ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/>). Las secuencias de 318 aminoácidos deducidas a partir de las secuencias de ADN amplificadas de los ADN complementarios de garrapatas fueron idénticas entre ellas (SEQ ID NO. 3) y presentaron una identidad del 95% y del 93%, con respecto a las secuencias de la proteína ribosomal P0 de *Haemaphysalis longicornis* y de *Ixodes scapularis* (Genebank, número de acceso DQ066213), respectivamente. Esta secuencia presentó además una identidad del 96% con la secuencia polipeptídica deducida a partir de un marco de lectura parcial incluido dentro del TC533 de la base de datos de *Amblyoma variegatum*, y del 99% con las deducidas a partir de dos marcos abiertos de lectura, contenidos en el TC1424 y el TC9038, de las bases de datos de ESTs de *R. appendiculatus* y *R. microplus*, respectivamente (<http://compbio.dfci.harvard.edu/index.html>).

La secuencia polipeptídica correspondiente a la proteína P0 de *R. sanguineus* y *R. microplus* denominada como SEQ ID NO. 3 presenta además una identidad de secuencia del 70% con la P0 de bovino (*Bos taurus*, Genebank número de acceso AAX09097), siendo del 87% para los últimos 16 aminoácidos que componen la región C-terminal, descrita como la zona más inmunogénica dentro de la proteína. Esta secuencia presenta además una identidad de secuencia del 71% con la proteína P0 de perro (*Canis familiaris*, Genebank número de acceso XM535894).

En el caso de la secuencia aminoacídica de la P0 deducida a partir de la secuencia de ADN complementario de *C. rogercresseyi*, se observó un alto porcentaje de identidad con las secuencias informadas para otras especies de piojos de mar, como *C. clemensi* y *L. salmonis*. Al igual que en el caso de las garrapatas y sus hospederos, existió una elevada identidad de secuencia entre la P0 de los piojos

de mar con respecto a la P0 de *Salmo salar* (Genebank número de acceso ACI70184).

La elevada identidad de secuencia existente entre las P0 de estos ectoparásitos con respecto a las P0 de sus organismos hospedantes hace muy riesgoso utilizar esta molécula como antígeno vacunal para controlar sus infestaciones, debido a la posibilidad de generar autoinmunidad contra la proteína del hospedero. Este riesgo se incrementa para el uso de la región C-terminal (últimos 11-16 aminoácidos), la cual se encuentra altamente conservada entre todos estos organismos.

La región de la proteína P0 de ambas especies de garrapatas que presenta menor similitud de secuencia con las proteínas P0 de mamíferos se encuentra comprendida entre los aminoácidos 267 y 301 (SEQ ID NO.4). Mediante el uso de herramientas bioinformáticas incluidas en el sitio <http://www.ca.expasy.org/sprot/>, se comprobó que esta región de la proteína coincide con una zona de baja hidrofobicidad, la cual tiene altas posibilidades de encontrarse expuesta en la proteína (Figura 1). Con posterioridad, se evaluó la capacidad inmunogénica de este péptido y su utilidad como antígeno vacunal para el control de las infestaciones por estas u otras especies de garrapatas.

Al traducir la secuencia del gen clonado que codifica para la proteína P0 del piojo de mar *Caligus rogercresseyi*, se identificó un péptido similar, de baja homología con la P0 de *Salmo salar* en la misma región comprendida entre los aminoácidos 267 y 301 (SEQ ID NO. 10, pP0Cr). Además, se identificaron también las mismas regiones de menor similitud aminoacídica (SEQ ID NO. 8 y 9, pP0Cc y pP0Ls) en las proteínas P0 reportadas para *Caligus clemensi* (Genebank número de acceso ACO14779) y *Lepeophtheirus salmonis* (Genebank, número de acceso ACO12290).

Ejemplo 3. Síntesis de los péptidos y conjugación a la KLH.

Los péptidos definidos como SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 9 y SEQ ID NO.10, y fragmentos de 20 aminoácidos de dichos péptidos, se obtuvieron por síntesis química y se purificaron mediante cromatografía en fase reversa empleando un sistema de HPLC (del inglés: *Reverse Phase-High Pressure Liquid Chromatograph*). Se obtuvieron 15 miligramos de cada péptido sintético, con una pureza del 99,3%. La masa molecular de cada uno se verificó mediante espectrometría de masas.

Con el propósito de potenciar las capacidades inmunogénicas de los péptidos se fusionaron a la proteína KLH. Las conjugaciones de los péptidos sintéticos con KLH se realizaron mediante el método de la carbodiimida soluble. La unión de estos se realizó utilizando el anhídrido succínico como agente espaciador. La separación de los conjugados se realizó mediante cromatografía de filtración en gel. La concentración final de cada conjugado se estimó mediante el método del ácido bicinefónico.

Ejemplo 4. Obtención de suero hiperinmune de ratón contra el péptido de la proteína ribosomal P0 de *R. microplus* y *R. sanguineus* (pP0).

Se emplearon seis ratones Balb/c, machos, de 6 semanas de edad, con masas corporales entre los 18 y 22 g, los cuales se inmunizaron por vía subcutánea en los días 0, 14, 21 y 28 con 250 µg del conjugado pP0-KLH (equivalente a 125 µg del péptido y 125 µg de KLH) en adyuvante de Freund. Las extracciones de sangre se realizaron en los días 0, 7, 14, 21, 40 y 65. Los animales se desangraron a los 65 días y los sueros se obtuvieron por centrifugación durante 10 minutos a 3500 rpm.

La cinética de anticuerpos se monitoreó mediante un ELISA indirecto. Para el recubrimiento de las placas se utilizó 1 µg por pocillo del pP0 y la detección se realizó con un anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante en dilución 1:15000. El revelado se llevó a cabo empleando una Solución Sustrato que contenía o-fenilendiamina 0,4 mg/mL en ácido cítrico 0,1 M; NaH₂PO₄ 0,2 M; pH 5,0 y peróxido de hidrógeno 0,015%. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2,5 M. El título de anticuerpos se estableció como el inverso de la mayor dilución a la cual la media de la DO del suero en cuestión es tres veces la media de la DO de un suero control negativo.

Los animales inmunizados mostraron títulos de anticuerpos específicos contra el péptido a partir del día 14 del experimento, los cuales llegaron a ser de 1:10240 para dos de los animales en el día 65 (Figura 2). Una mezcla que contiene igual cantidad de los sueros hiperinmunes obtenidos a partir de los seis ratones inmunizados con el conjugado pP0-KLH se empleó como anticuerpo policlonal en los ensayos de expresión y de reactividad cruzada "in vitro".

Ejemplo 5. Expresión de la proteína ribosomal P0 de garrapatas *Rhipicephalus* en la línea celular RK-13 y ensayo de reactividad cruzada “*in vitro*”.

La secuencia de ADN que codifica para la proteína ribosomal P0 de *R. sanguineus* (SEQ ID NO.2) se clonó en el plasmidio pAdTrack-CMV (9,2 kb), bajo el control del promotor/potenciador inmediato/temprano del citomegalovirus humano (pCMVITh) y la señal de terminación/poliadenilación tardía del virus vesicular de los simios SV40. Este vector contiene en su secuencia el gen reportero que codifica para la proteína fluorescente verde (del inglés: *Green Fluorescent Protein*, abreviado GFP) y el gen que confiere resistencia a kanamicina (He T. C. *et al.*; Proc Natl Acad Sci U S A. 1998, 95: 2509-2514). El plasmidio resultante se utilizó para transfectar la línea celular RK-13 de riñón de conejo. La transfección se realizó utilizando lipofectamina (Invitrogen, Estados Unidos), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La eficiencia de la transfección se comprobó luego de 24 horas, mediante la observación de la expresión de la GFP al microscopio óptico, empleando luz ultravioleta y una magnificación de 40X.

Luego de 48 h se procedió a la lisis celular y los extractos celulares obtenidos se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % (SDS-PAGE), empleando condiciones reductoras y desnaturalizantes, según la técnica descrita por Laemmli (Laemmli U. K.; Nature 1970, 227: 680-685).

El patrón de expresión de la proteína ribosomal P0 de garrapatas *Rhipicephalus* se analizó mediante *Western blotting*, utilizando como anticuerpo primario el suero policlonal contra el péptido obtenido en ratones (diluido 1:3000) y como anticuerpo secundario un anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa en dilución 1:10000 (Figura 3). En la muestra correspondiente a las células transfectadas con el plasmidio se detectó una banda única a la talla esperada para la proteína P0, de aproximadamente 35 kDa. La presencia de una banda similar en la muestra corrida en condiciones no reductoras indicó que este péptido se encuentra expuesto en la estructura tridimensional de la proteína. No se detectó ninguna banda en el carril correspondiente a la muestra control negativo (células RK-13 de conejos no transfectadas), lo que indicó que los anticuerpos generados en ratón contra el péptido de 35 aminoácidos de la proteína P0 de garrapatas *Rhipicephalus* no son capaces de reconocer al péptido correspondiente en la proteína P0 de conejo quedando demostrada la ausencia de reactividad cruzada

entre el péptido inmunogénico de garrapatas y el péptido correspondiente en la proteína ribosomal P0 de conejo.

Ejemplo 6. Determinación de la inmunogenicidad del péptido pP0 de garrapatas *Rhipicephalus* y de su capacidad protectora frente a infestaciones con la garrapata *R. sanguineus*.

Se procedió a evaluar la utilidad del péptido de la proteína ribosomal P0 de *R. microplus* y *R. sanguineus* como antígeno vacunal contra la garrapata *R. sanguineus*. Para ello, 20 conejos Nueva Zelanda blancos, machos, de entre 12 y 14 semanas de vida y masa corporal sobre los 2,5 kg se distribuyeron al azar en tres grupos experimentales de siete conejos para los grupos de pP0-KLH y Bm86 y de 6 conejos para el grupo control negativo inmunizado con KLH. Los inmunógenos, contenidos en PBS1X, se adyuvaron en Montanide 888 VG (preparado al 10% en aceite mineral) en una proporción 60/40 de inmunógeno/adyuvante. Los grupos experimentales se distribuyeron de la siguiente forma:

Grupo 1: Inmunización por vía subcutánea con el conjugado pP0-KLH en dosis de 500 µg/animal (equivalente a 250 µg de péptido/animal) en los días 0, 21, 36 y 60.

Grupo 2 (control negativo): Inmunización por vía subcutánea con KLH en dosis de 250 µg/animal en los días 0, 21, 36 y 60.

Grupo 3 (control positivo): Inmunización por vía subcutánea con la proteína Bm86 de *R. microplus* en dosis de 100 µg/animal en los días 0 y 28.

El ensayo tuvo una duración de 120 días. Se tomaron muestras de suero a los animales para medir la respuesta de anticuerpos en los días 0, 14, 21, 28, 36, 59, 73 y 87. Se observó diariamente el comportamiento general y la temperatura corporal de los mismos durante todo el ensayo. Se colocaron tres cámaras por animal en el día 72 del experimento y se infestó cada animal en el día 73 con aproximadamente 250 larvas, 100 ninfas y 50 neoginas (20 machos y 30 hembras) de *R. sanguineus*. La colecta, conteo, pesaje y análisis de la muda de las garrapatas se realizó entre los días 75 y 120. Las larvas y ninfas colectadas se mantuvieron en una incubadora a 28°C, con 80% de humedad relativa y un fotoperíodo de 12:12 h (luz: oscuridad). Las teleoginas hembras ingurgitadas se

mantuvieron en placas plásticas individuales inmovilizadas hasta oviposición en las mismas condiciones.

No se observó cambio en el comportamiento normal, ni fiebre en ninguno de los animales. La respuesta humoral generada contra cada uno de los inmunógenos se estudió mediante ELISA indirecto similar al descrito anteriormente, recubriendo las placas con 1 µg por pocillo de cada antígeno y utilizando en este caso un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidada (SIGMA) en dilución 1:10000. Las medias de los títulos de anticuerpos se determinaron a partir de los valores individuales en cada grupo. Títulos específicos contra Bm86 sólo se obtuvieron en los animales del grupo 3 inmunizados con Bm 86. Títulos específicos contra el péptido de P0 (pP0) se obtuvieron sólo en el grupo 1 de animales inmunizados con el conjugado pP0-KLH y títulos específicos contra KLH se obtuvieron en los grupos 1 y 2 inmunizados con el conjugado pP0-KLH y con KLH sola (Figura 4).

Para estudiar el efecto de los inmunógenos sobre las garrapatas *R. sanguineus* se analizó el comportamiento de varios parámetros biológicos de las mismas. En larvas, ninfas y adultas se analizó el tiempo promedio de alimentación y la recuperación. En el caso de larvas y ninfas se analizó además la muda y la capacidad del estadio posterior obtenido, de infestar un animal virgen. En el caso de adultas se estudió además el peso de la hembra ingurgitada, el peso del aove y el porcentaje de eclosión. El índice de eficiencia de conversión a huevos se calculó según se ha descrito previamente (Bennett G. F. *et al.*; Acarologia 1974, 16: 52–61), como el porcentaje de peso de la hembra convertido en huevos. De manera general, las larvas, ninfas y neoginas del grupo inmunizado con Bm86 tardaron más tiempo en alimentarse que los mismos estadios sobre los animales controles y vacunados con el péptido P0. Los valores de recuperación de larvas, ninfas y neoginas entre los tres grupos se compararon mediante un ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni ($p < 0.01$). En el caso de las larvas y ninfas se analizó la supervivencia o viabilidad como la cantidad final del estadio siguiente que fue capaz de infestar animales vírgenes con respecto a la cantidad de larvas y ninfas mudadas. Para las neoginas, la supervivencia se midió como el número final de garrapatas capaces de sobrevivir luego de la incubación y con capacidad de ovipositar. La media de la recuperación de larvas no mostró diferencias

estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. En el caso de la recuperación de ninfas, a pesar de una tendencia a recuperar menos ninfas alimentadas sobre los grupos inmunizados tanto con pP0-KLH como con Bm86 no existieron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control inmunizado con KLH. En el caso de las adultas, la recuperación mostró diferencias estadísticamente significativas para el grupo vacunado con el antígeno pP0 con relación a los grupos control negativo y vacunados con Bm86. (Figura 5).

Se observaron serias afectaciones en la viabilidad y apariencia de las ninfas recién mudadas a partir de las larvas alimentadas en los grupos vacunados con ambos antígenos respecto a las colectadas sobre el grupo control. En el grupo vacunado con el pP0-KLH se observó una elevada mortalidad de las ninfas recién mudadas con una afectación evidente de la morfología, existiendo diferencias estadísticamente significativas de este parámetro en el grupo vacunado con el pP0-KLH respecto a los grupos control negativo y al vacunado con Bm86. Hay además diferencias significativas en la viabilidad entre el grupo vacunado con Bm86 y el grupo control negativo (Figura 6). En la Tabla 1 aparecen los porcentos de mortalidad en cada grupo experimental.

Tabla 1. Porcientos de mortalidad de las ninfas recién mudadas a partir de larvas alimentadas en los tres grupos experimentales. Las letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas obtenidas por un ANOVA seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni ($P<0,001$) de los datos transformados.

Estadio	Mortalidad (%)
pP0-KLH	77,70 ^b
KLH	13,45 ^a
Bm86	44,70 ^c

La capacidad de las ninfas y neoginas recién mudadas y de las larvas recién eclosionadas provenientes de los grupos experimentales para infestar un nuevo animal se determinó mediante la infestación de perros vírgenes con los ejemplares recuperados, mudados y viables de cada grupo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para este parámetro entre los grupos experimentales.

El análisis estadístico de los datos de peso de la teleogina y del aove se realizó mediante un ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas para ambos parámetros entre los grupos experimentales. El índice de eficiencia de conversión a huevos tampoco presentó diferencias significativas entre los grupos vacunados y el grupo control. En este punto debemos destacar que el 10% de las neoginas alimentadas sobre conejos inmunizados con pP0-KLH no pusieron huevos respecto a un 3% en el grupo control inmunizado con KLH y un 6% no puso huevos en el grupo alimentado sobre conejos inmunizados con Bm86. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) en el % de eclosión de los huevos en el grupo inmunizado con pP0-KLH respecto al grupo control inmunizado con KLH (Figura 7). Aunque en el grupo inmunizado con Bm86 hubo un porcentaje de eclosión menor que en el grupo control negativo, estas diferencias no resultaron significativas desde el punto de vista estadístico. Las larvas eclosionadas de los huevos de los tres grupos experimentales fueron capaces de infestar perros y alimentarse normalmente.

Se realizaron experimentos con resultados similares a los descritos previamente en este ejemplo, inmunizando los conejos con fragmentos de 20 aminoácidos del pP0. Los péptidos evaluados tienen las siguientes secuencias aminoacídicas: AAGGGAAAKPEESKKEEAK, EYLKDPSKFAAAAAPAAGGG y FAAAAAPAAGGGAAAKPEE. Dichos péptidos se conjugaron a KLH. Los mejores resultados se obtuvieron con el péptido correspondiente a los últimos 20 aminoácidos del pP0.

Ejemplo 7. Determinación de la inmunogenicidad del pP0 de *R. microplus* y *R. sanguineus* fusionado a diferentes moléculas inmunopotenciadoras.

La proteína de la cápsida VP60 del RHDV (cepa AST/89) se ha obtenido con altos niveles de expresión en el sobrenadante de ruptura de la levadura *Pichia pastoris*. Esta proteína obtenida por vía recombinante forma multímeros de alto peso molecular con características antigénicas y estructurales similares a la partícula viral nativa (Farnós O. *et al.*; Antiv. Res. 2009, 81: 25-36). Aprovechando la alta capacidad inmunogénica de estas partículas semejantes a virus (VLPs), se generó una construcción de ADN recombinante para obtener el pP0 expuesto sobre la

superficie de las VLPs del RHDV. Para ello, la secuencia nucleotídica que codifica para el fragmento de 20 aa desde la posición 15 a la 35 de la SEQ ID No.4 de dicho péptido (AAGGGAAAKPEESKKEEAK) se insertó en el plasmidio pNAOVP60, en la posición del dominio protuberante del gen de la proteína VP60.

- 5 Esta construcción permite que el pP0 se exprese fusionado al extremo C-terminal de la VP60, región que queda expuesta al exterior luego del ensamblaje de las VLPs. El plasmidio recombinante obtenido se empleó para transformar la cepa MP36 de *P. pastoris*. La proteína VP60pP0 se obtuvo soluble en el sobrenadante de ruptura a niveles de 350 mg/L. La exposición de la región C-terminal y la
- 10 formación de VLPs se verificaron mediante un ELISA sandwich utilizando un suero hiperinmune anti-RHDV y los anticuerpos monoclonales 6H6 y 1H8 (gentilmente donados por el Dr. Lorenzo Capucci del Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia, Brescia, Italia), que reconocen epitopos presentes en la región C-terminal de la proteína VP60 y en partículas virales o VLPs correctamente
- 15 ensambladas, respectivamente (Capucci L. *et al.*; Virus. Res. 1995, 37: 221–238). Las VLPs de VP60pP0 se purificaron mediante HPLC en una columna TSK-G3000PW, obteniéndose con una pureza aproximada del 50 %.

- La otra construcción recombinante fue realizada con el mismo péptido de 20 a.a. de P0 acoplado a varios epitopos de células T promiscuos. Específicamente, se
- 20 usaron epitopos ttP2 del toxoide tetánico y el epitopo de células T del virus del sarampión (TT-MVF). Se insertaron varias copias de la secuencia de ADN del pP0 de 20 a.a (AAGGGAAAKPEESKKEEAK) y de los antígenos T promiscuos fusionados a la inteína de *Saccharomyces cerevisiae* en el plasmidio pTBY 12 bajo el control del promotor T7 y el represor del operón lac que permite la expresión de
- 25 la proteína de fusión sólo después de la inducción con IPTG. El plasmidio recombinante obtenido se utilizó para transformar la cepa ER2566 de *E coli*. El péptido quimérico TT-MVF-pP0- inteína fue detectado en el sobrenadante de ruptura de esta cepa por el suero policlonal murino anti-pP0. Los niveles de expresión se estimaron en aproximadamente 100 mg/L de cultivo. El péptido fue
- 30 purificado por afinidad a una columna de quitina y autodigerido en la presencia de grupos tioles para liberar el péptido de interés.

Se realizó un experimento de inmunización en conejos para evaluar la capacidad inmunogénica de las variantes quiméricas obtenidas y el efecto de los anticuerpos

generados sobre las larvas, ninfas y neoginas de *R. sanguineus* en comparación al efecto del péptido sintético de la proteína ribosomal P0 conjugado a hemocianina. Para ello, 28 conejos Nueva Zelanda, blancos y machos, se distribuyeron al azar en 4 grupos de 7 animales cada uno. Los inmunógenos se adyuvaron en Montanide 888 VG y se administraron de la siguiente forma:

Grupo 1: Inmunización por vía subcutánea con el conjugado pP0-KLH en dosis de 500 µg/animal (equivalente a 250 µg de péptido/animal).

Grupo 2 (control negativo): Inmunización por vía subcutánea con KLH en dosis de 250 µg/animal.

Grupo 3: Inmunización por vía subcutánea con las VLPsVP60pP0 en dosis equivalente a 250 µg de proteína/animal.

Grupo 4: Inmunización por vía subcutánea con el péptido quimérico TT-MVF-pP0, en dosis equivalente a 250 µg de péptido/animal.

El ensayo tuvo una duración de 90 días. Los animales se inmunizaron los días 0, 21 y 36. Las extracciones de los sueros, la determinación de los títulos de anticuerpos, y la infestación y colecta de las garrapatas, se realizaron de manera similar a lo descrito en el Ejemplo 6.

Para el análisis estadístico, los valores de recuperación y viabilidad de garrapatas se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se detectaron los mayores títulos de anticuerpos anti-péptido P0 en los animales vacunados con la quimera VLPsVP60pP0 a partir del día 14 post-inmunización. Estos anticuerpos alcanzaron títulos superiores a 1:5000 para la variante quimérica VLPsVP60pP0 a partir del día 21, y a partir del día 28 para los animales inmunizados con la quimera TT-MVF-pP0. Los títulos se mantuvieron hasta el final del experimento (Figura 8 A).

La media de la viabilidad de las larvas y la recuperación de ninfas y neoginas mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) para los grupos vacunados con las variantes quiméricas del péptido de la P0 con respecto al grupo control negativo, inmunizado con KLH. (Figura 8 B). En la Tabla 2 aparece la disminución respecto al grupo control negativo en el porcentaje de viabilidad de las larvas y en el porcentaje de recuperación de ninfas y adultas por grupos experimentales.

Tabla 2. Disminución en el porcentaje de recuperación de garrapatas en cada estadio respecto al grupo control inmunizado con KLH.

Estadio	pP0-KLH (%)	TT-MVF-pP0 (%)	VLPsVP60pP0 (%)
Larvas	30,00	28,00	34,00
Ninfas	38,00	16,00	42,00
Adultas	36,67	30,00	36,67

Ejemplo 8. Determinación de la capacidad protectora de la proteína quimérica Bm86-pP0 respecto a la del pP0, frente a infestaciones con la garrapata *R. microplus*.

El antígeno Bm86 de la garrapata *R. microplus* se expresó con anterioridad en la cepa MP36 de *P. pastoris* (Valle M. R. *et al.*, J. Biotech. 1994, 33: 135-146). En esa construcción se eliminaron los fragmentos del gen correspondientes al péptido señal y a la región transmembrana de la proteína (SEQ ID NO. 5). Para la construcción de la proteína quimérica Bm86-pP0 se insertó la secuencia nucleotídica de la proteína Bm86 descrita anteriormente, a continuación de la señal de secreción de la sacarosa invertasa de *S. cerevisiae* (*ssSUC2*) en el plasmidio pPS10 bajo el control del promotor *AOX 1*. A esta secuencia de Bm86 se fusionó la secuencia de ADN que codifica para el péptido de 35 aminoácidos de la proteína ribosomal P0 de *R. microplus*. La cepa MP36 de *P. pastoris* se transformó con el plasmidio resultante y los transformantes se seleccionaron mediante la reversión de la auxotrofia al aminoácido histidina. Los clones obtenidos se indujeron con metanol después de alcanzar una DO entre 3 y 4 en el cultivo celular. Luego de 96 horas de inducción se realizó el análisis de expresión mediante *Western blotting*, utilizando un suero hiperinmune murino anti-pP0 (referido en el Ejemplo 4) y por un anticuerpo policlonal anti-Bm86 (Figura 9A y 9B). La proteína recombinante se detectó en el precipitado de ruptura celular a niveles de 300 mg/L. En dicho análisis se observó una banda de 100 kDa, correspondiente a la proteína glicosilada, la cual se redujo a una banda de aproximadamente 70 kDa, coincidente con la talla esperada para la proteína, luego de la digestión con la enzima PNGasa F. No se observó ninguna banda en la muestra analizada en condiciones no reductoras, lo cual sugirió la formación de estructuras multiméricas, que fueron incapaces de entrar en el gel de poliacrilamida. La presencia de estos

agregados proteicos de alto peso molecular en el precipitado de ruptura se verificó mediante microscopía electrónica. La proteína quimérica se purificó por el método de precipitación ácida, obteniéndose con una pureza de aproximadamente 95%.

Se realizó un ensayo de inmunización en bovinos donde se compararon los efectos sobre *R. microplus* del pP0 conjugado a KLH, de la proteína Bm86, de la proteína quimérica Bm86-pP0 y de la co administración de los antígenos pP0_KLH y Bm86 como candidatos vacunales. Para ello, 20 bovinos libres de garrapatas, de más de 240 kg de peso se distribuyeron al azar en cinco grupos experimentales de 4 animales cada uno. Los inmunógenos se administraron en Montanide 888 VG (preparado al 10% en aceite mineral) en proporción 60/40 de fase acuosa/fase oleosa. Los grupos experimentales se concibieron de la siguiente forma:

Grupo 1: Inmunización por vía intramuscular con el conjugado pP0-KLH en dosis de 500 µg de conjugado/animal (equivalente a 250 µg de péptido/animal) con el esquema de 0, 4 y 7 semanas.

Grupo 2 (control negativo): Inmunización por vía intramuscular con KLH en dosis de 250 µg/animal con el esquema de 0, 4 y 7 semanas.

Grupo 3 (control positivo): Inmunización por vía intramuscular con la proteína Bm86 de *R. microplus* en dosis de 250 µg/animal con el esquema de 0, 4 y 7 semanas.

Grupo 4: Inmunización por vía intramuscular con la proteína quimérica Bm86-pP0 en dosis de 250 µg/animal con el esquema de 0, 4 y 7 semanas.

Grupo 5: Inmunización por vía intramuscular con la proteína Bm86 y el conjugado pP0-KLH en dosis de 250 µg de Bm86/animal y 500 µg del conjugado/animal con el esquema de 0, 4 y 7 semanas.

El ensayo tuvo una duración total de 140 días. Se tomaron muestras de suero a los animales para medir la respuesta de anticuerpos en los días 0, 14, 28, 49, 70, 82, 120 y 140. Se colocaron cuatro cámaras por animal en el día 82 del experimento y se infestó con 3000 larvas por cámara (12000 larvas por animal) de *R. microplus* a razón de 4000 larvas diarias entre los días 84 y 86. La colecta, conteo y pesaje de las garrapatas se realizó entre los días 107 y 117. Las teleoginas hembras ingurgitadas se mantuvieron en placas plásticas individuales a 28°C, 90 % de humedad relativa y con un fotoperíodo de 12 horas de luz.

La cinética de anticuerpos anti-pP0 y anti-Bm86 se estudió por ELISA, utilizando en este caso un conjugado anti-bovino-peroxidasa (SIGMA) en dilución 1:10000. Se detectó una respuesta de anticuerpos IgG específicos contra Bm86 y contra el pP0 a partir del día 14, en todos los animales inmunizados con estos antígenos.

Estos anticuerpos alcanzaron títulos superiores a 1:5000 luego del día 28 para Bm86 y entre los días 60 y 90 para el caso del péptido P0, los que se mantuvieron hasta el final del experimento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los títulos de anticuerpos anti-Bm86 ni anti-pP0 entre los grupos inoculados con ambos antígenos por separado o combinados, ni con respecto al grupo vacunado con la quimera Bm86-pP0 (Figura 10).

Se analizó el efecto de los anticuerpos generados sobre la recuperación, el peso de la teleogina y del aove y el porcentaje de eclosión de *R. microplus*. La recuperación de teleoginas disminuyó de manera significativa en todos los grupos vacunados con respecto al grupo control negativo del experimento. Para el grupo inmunizado con Bm86 respecto al grupo control negativo la disminución de la recuperación de garrapatas fue del 32,6%, del 55,2 % para el grupo inmunizado con pP0-KLH, del 62,13 % para el grupo inmunizado con los dos antígenos individuales y del 65,2% para el grupo inmuniado con la quimera Bm86-pP0. Este parámetro fue significativamente menor para los grupos inmunizados con la quimera Bm86-pP0 y con la combinación de Bm86 y pP0-KLH respecto a los grupos donde estos antígenos fueron aplicados de manera individual. No hubo diferencias significativas del grupo inmunizado con la quimera con respecto al grupo inmunizado con la combinación de los dos antígenos. Los parámetros de peso de la teleogina y peso del aove mostraron una afectación significativa en los grupos inmunizados con Bm86 respecto al control negativo (ANOVA y prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls [$p < 0,05$]). Se observó una disminución significativa para estos parámetros biológicos en los grupos inmunizados con la quimera Bm86-pP0 y con la combinación de los antígenos, con respecto a los grupos vacunados con los antígenos individuales (Figura 11). El porcentaje de eclosión de los huevos en el grupo control negativo fue del 87,4%, mientras que para los grupos inmunizados con Bm86, pP0-KLH, la combinación de Bm86 y pP0-KLH y la quimera Bm86-pP0 fue de 75,1%, 64,6%, 54,8% y 55,9%; respectivamente, mostrando una disminución significativa en todos los grupos

respecto al control. Estos resultados evidencian que la vacunación con una formulación que contiene el péptido de la proteína ribosomal P0 objeto de esta invención ya sea fusionado a la proteína Bm86 que combinado con ella provoca una mayor afectación en la supervivencia y parámetros biológicos de *R. microplus*, lo que se traduce en un control más eficiente de las infestaciones de esta garrapata.

Ejemplo 9. Determinación de la capacidad protectora del péptido de la proteína P0 de *Ixodes scapularis* (pP0Is) frente a infestaciones con la garrapata *I. scapularis*.

Se procedió a evaluar la capacidad inmunogénica del péptido comprendido entre los aminoácidos 267-302 de la proteína ribosomal P0 de *I. scapularis*, homólogo al péptido inmunogénico de la proteínas P0 de *R. microplus* y *R. sanguineus*. Estos péptidos presentan una identidad de secuencia entre ellos del 68%. La síntesis química del péptido de *I. scapularis* y la conjugación a la hemocianina KLH se realizó de manera similar a lo descrito en el Ejemplo 3. Posteriormente, 12 conejos Nueva Zelanda blancos, machos, se distribuyeron al azar en dos grupos experimentales de seis conejos cada uno, los cuales se inmunizaron y retaron con larvas, ninfas y neoginas de *I. scapularis*. Los inmunógenos se adyuvaron en Montanide 888 VG en una proporción 60/40 de inmunógeno/adyuvante y se aplicaron de la siguiente forma:

Grupo 1: Inmunización por vía subcutánea con el conjugado pP0Is-KLH en dosis de 500 µg/animal (equivalente a 250 µg de péptido/animal).

Grupo 2 (control negativo): Inmunización por vía subcutánea con KLH en dosis de 250 µg/animal.

Ambos grupos se inmunizaron en los días 0, 21 y 36. Las extracciones de los sueros se realizaron a los días 0, 14, 21, 28, 36 y 60 de comenzado el experimento. La determinación de los títulos de anticuerpos anti-péptidoP0 y la infestación, colecta, conteo y mantenimiento de las garrapatas se realizaron de manera similar a lo descrito en el Ejemplo 6.

No se observó cambio en el comportamiento normal, ni fiebre en ninguno de los animales. Se detectaron títulos de anticuerpos anti-pP0Is en los animales inmunizados con el conjugado pP0Is-KLH a partir del día 14 post-inmunización.

Estos anticuerpos alcanzaron títulos superiores a 1:3500 en el día 36, los que se mantuvieron hasta el final del experimento (Figura 12).

A las 168 horas, ya se habían colectado todas los estadíos alimentados de los dos grupos. La recuperación y viabilidad de todos los estadíos de garrapatas con que se infestaron los animales, el peso de las teleoginas y del aove y el % de eclosión de los huevos se compararon entre los grupos mediante un ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni ($p < 0.05$). La recuperación de ninfas y teleoginas mostraron diferencias estadísticamente significativas en el grupo vacunado con el conjugado pP0ls-KLH con respecto al grupo control negativo. Se evidenció una elevada mortalidad de larvas alimentadas y recién mudadas con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 13 A). El peso de las teleoginas y del aove no presentaron diferencias estadísticamente significativas. El índice de eficiencia de conversión a huevos fue del 45,49% en el grupo control negativo y del 40,19% en el inmunizado con el conjugado pP0ls-KLH y el porcentaje de eclosión de los huevos fue del 95,20% para el control negativo y del 83,10% para el grupo inmunizado con el conjugado. Este último parámetro resultó significativo cuando se le realizó el análisis estadístico (Figura 13 B).

Ejemplo 10. Determinación de la capacidad protectora del pP0 de *L. salmonis* (pP0Ls).

Para evaluar la utilidad del pP0Ls como antígeno vacunal se distribuyeron 80 salmones de un peso promedio de 80 g en 4 grupos, de 20 peces cada uno. Dos grupos se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) con el conjugado P0Ls-KLH, a una dosis de 10 μ g del conjugado/g de peso corporal de los salmones (equivalente a 5 μ g de pP0Ls/g de peso del salmón), formulado en el adyuvante oleoso Montanide 888. Los otros dos grupos fueron controles negativos inmunizados con 5 μ g de KLH /g de peso corporal, adyuvado en Montanide 888. Transcurridas 500 unidades térmicas arbitrarias, los salmones se adaptaron a agua de mar y se infestaron con 2000 ± 200 copepoditos por estanque. El desafío se llevó a cabo bajo condiciones de oscuridad, aireación constante, oxigenación de apoyo, control de temperatura (15-17 °C) y salinidad (aprox. 30 ppm). Con el fin de evitar la pérdida de copepoditos y facilitar la fijación de los mismos, el flujo de agua en los estanques se mantuvo cerrado y se efectuó el recambio manual cada 48 horas

además de que se instalaron tamices de 220 μ en los tubos de desagüe. El momento de la inclusión de los copepoditos se definió como el día 0. Estas condiciones se mantuvieron por 40 días desde el inicio del desafío.

A los 40 días se sacrificaron los peces, por una sobredosis de anestesia, y se procedió a la evaluación de los resultados mediante el conteo de parásitos. Los resultados que aparecen en la Tabla 3 mostraron una disminución significativa en el número de parásitos por pez en los grupos vacunados con pP0Ls-KLH, en comparación con los controles negativos vacunados solamente con KLH.

Tabla 3. Resultados del conteo de parásitos al concluir el experimento de reto.

Parámetros	Grupo vacunado 1	Grupo vacunado 2	Control 1	Control 2
Número de parásitos/pez	15±6 ^a	16±6 ^a	38±9 ^b	37±10 ^b
% de sobrevivencia de los peces	95	90	95	85
% Inhibición de la infestación	60	56	-	-

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Se aplicó un test de comparaciones múltiples de Dunn ($p<0,001$).

De igual forma, se realizaron experimentos con resultados similares a los descritos en este ejemplo, pero los salmones se inmunizaron con fragmentos de 20 aminoácidos del péptido pP0Ls. Los péptidos evaluados tenían la secuencia PAAGATKAAAAAPAKADEPE, SKFASVAAAPAAGATKAAAA, y EYLADPSKFASVAAAPAAGA, respectivamente, y se conjugaron a KLH. Aunque todos los péptidos confirieron protección, los mejores resultados se obtuvieron con el péptido correspondiente a los últimos 20 aminoácidos del pP0Ls.

Ejemplo 11. Determinación de la capacidad protectora del péptido de la proteína P0 de *C. rogercresseyi* (pP0Cr) fusionado a epitopos T promiscuos y del conjugado pP0Cr-KLH.

Se evaluó la capacidad inmunogénica del conjugado pP0Cr-KLH y del pP0Cr fusionado a otras moléculas inmunopotenciadoras como los epitopos T promiscuos. En este caso se utilizaron igualmente los epitopos ttP2 del toxoide

tetánico y el epitopo de células T del virus del sarampión (TT-MVF). El péptido quimérico TT-MVF-pP0Cr fue detectado en el sobrenadante de cultivo de la cepa MP36 de *P. pastoris* transformada con un plasmidio que contenía una copia de la secuencia codificante para el pP0Cr fusionada en su extremo N-terminal a dos copias de los epitopos T promiscuos bajo el control del promotor de la alcohol oxidasa 1 (AOX 1), precedido todo por la señal de secreción de la sacarosa invertasa de *S. cerevisiae* (ssSUC2). Los niveles de expresión se estimaron en aproximadamente 150 mg/L de cultivo.

Se procedió a evaluar la utilidad de este polipéptido, obtenido por vía recombinante, como antígeno vacunal y compararlo con los efectos del conjugado pP0Cr-KLH. Para ello 120 salmones de un peso promedio de 80 g se distribuyeron en 6 grupos, de 20 peces cada uno. Los grupos experimentales fueron:

Grupos 1 y 2: Se inyectaron por vía i.p. con el conjugado pP0Cr-KLH, a una dosis de 10 µg/g de peso corporal (equivalente a 5 µg de pP0Cr /g de peso).

Grupos 3 y 4: Se inyectaron por vía i.p. con KLH, a una dosis de 5 µg/g de peso.

Grupos 5 y 6: Se inyectaron por vía i.p. con la proteína quimérica TT-MVF-pP0Cr, a una dosis de 5 µg/g de peso.

En todos los casos, el inmunogeno fue formulado en el adyuvante oleoso Montanide 888. El procedimiento experimental fue similar al del Ejemplo 10, sólo que en este caso como el piojo de mar *C. rogercresseyi* tiene un ciclo de vida más corto, a los 24 días (después de completar dos ciclos de vida del parásito) se eliminaron los peces, por una sobredosis de anestesia, y se procedió a la evaluación de los resultados mediante el conteo de parásitos. En la tabla siguiente aparecen los resultados que mostraron una disminución significativa en el número de parásitos por pez en los grupos vacunados con pP0Cr-KLH y TT-MVF-pP0Cr, en comparación con los controles negativos vacunados solamente con KLH. La mayor protección, evaluada como número de parásitos/pez, se observó en el grupo TT-MVF-pP0Cr.

Tabla 4. Resultados del conteo de parásitos al concluir el experimento de reto.

Parámetro	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Número parásitos/pez	21±7 ^a	19±6 ^a	48±10 ^b	47±8 ^b	14±3 ^c	13±2 ^c
% de sobrevivencia de los peces	90	85	95	85	95	90
% inhibición de la infestación	55	60	-	-	70	72

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Se aplicó un test de comparaciones múltiples de Dunn ($p<0,001$).

Ejemplo 12. Determinación de la inmunogenicidad del pP0Cr fusionado al polipéptido my32.

Para evaluar la capacidad inmunogénica del pP0Cr fusionado al antígeno my32, previamente conocido, se generó el péptido quimérico my32-pP0Cr, utilizando el mismo procedimiento descrito en los ejemplos anteriores para todas las proteínas de fusión. En este caso, el plasmidio con el que se transformó la cepa MP36 de *P. pastoris* contenía una copia del pP0Cr fusionado por su extremo N-terminal a una copia de my32, bajo el control del promotor AOX 1, precedida por la señal de secreción ssSUC2. El péptido quimérico my32-pP0Cr fue detectado en el sobrenadante de cultivo en una concentración de aproximadamente 135 mg/L de cultivo.

Para evaluar la utilidad de este polipéptido obtenido por vía recombinante como antígeno vacunal, 160 salmones de un peso promedio de 80 g se distribuyeron en grupos, de 20 peces cada uno. Los grupos experimentales fueron:

Grupos 1 y 2: Se inyectaron con el conjugado pP0Cr-KLH a una dosis de 10 µg/g de peso corporal (equivalente a 5 µg de P0Cr /g de peso).

Grupos 3 y 4: Se inyectaron con KLH a una dosis de 5 µg/g de peso corporal.

Grupos 5 y 6: Se inyectaron con la proteína quimérica my32-pP0Cr, a una dosis de 5 µg/g de peso.

Grupos 7 y 8: Se inyectaron con la proteína my32, obtenida por vía recombinante, a una dosis de 5 µg/g de peso.

Todos los animales recibieron el inmunógeno por vía i.p. y adyuvado en Montanide 888. El procedimiento experimental seguido fue igual al del Ejemplo 11. En la Tabla 5 aparecen los resultados del muestreo a los 24 días post-reto, que evidencian una disminución significativa en el número de parásitos por pez en los grupos vacunados con pP0Cr-KLH, my32-pP0Cr y my32, en comparación con los animales inoculados solamente con KLH. La mayor protección, evaluada como número de parásitos/pez, se observó en el grupo my32-pP0Cr.

Tabla 5. Resultados del conteo de parásitos al concluir el experimento de reto.

Parámetro	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
No. parásitos/pez	17±7 ^a	15±6 ^a	30±9 ^b	31±8 ^b	3±1 ^c	4±2 ^c	15± 3 ^a	14±6 ^a
% de sobrevivencia de los peces	85	95	95	85	90	95	95	85
% inhibición de la infestación	43	50	-	-	90	87	50	53

10 Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Se aplicó un test de comparaciones múltiples de Dunn ($p<0,001$).

REIVINDICACIONES

1. Composición vacunal para el control de las infestaciones por ectoparásitos que comprende un péptido de la proteína ribosomal P0 de dichos ectoparásitos, correspondiente a la región entre los aminoácidos 267 y 301 de la proteína.
2. La composición según la reivindicación 1 donde dicho péptido tiene una secuencia aminoacídica identificada como SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9 o SEQ ID NO. 10, es un fragmento de dichas secuencias, o es un péptido o polipéptido que exhibe al menos una identidad del 70 % con dichas secuencias.
3. La composición según las reivindicaciones 1 y 2 donde dicho péptido ha sido fusionado, conjugado o co-administrado con otra molécula para incrementar su inmunogenicidad o potenciar su efecto protector.
4. La composición según la reivindicación 3 donde dicha molécula se selecciona dentro del grupo compuesto por la hemocianina, un epitopo de células T proveniente de la toxina tetánica o de la proteína de fusión del virus del sarampión, proteínas que forman partículas semejantes a virus del Virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo, la proteína Bm86 de la garrapata *R. microplus*, la proteína Rs86 de la garrapata *R. sanguineus* y la proteína my32 del piojo de mar *C. rogercresseyi* o *L. salmonis*.
5. La composición según la reivindicación 1, que se caracteriza por ser efectiva para el control de las infestaciones por garrapatas y/o piojos de mar y/o la transmisión de sus patógenos asociados.
6. La composición según las reivindicaciones 1 y 2 donde dicho péptido se obtiene por vía recombinante o síntesis química.
7. La composición según la reivindicación 6 donde la obtención del péptido por vía recombinante se logra mediante un sistema de expresión en levaduras, bacterias, plantas, larvas de insectos, células de insectos o células de mamíferos.
8. La composición según la reivindicación 1 que adicionalmente comprende un adyuvante vacunal.
9. La composición según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizada porque se administra por inyección, en un rango de 0,001-25 µg de péptido/g de peso

del animal vacunado; mediante formulaciones de pienso en un rango de 0,01-300 µg de péptido/g de pienso o mediante baños de inmersión para peces en un rango de 0,01-10 mg de péptido/L de agua.

5 10. Composición vacunal para el control de las infestaciones por ectoparásitos que comprende ácidos nucleicos que codifican para un péptido de la proteína ribosomal P0 de dichos ectoparásitos, correspondiente a la región entre los aminoácidos 267 y 301 de la proteína, y que genera una respuesta inmune contra dicho péptido mediante inmunización con ADN desnudo.

10 11. La composición según la reivindicación 10 donde dicho péptido tiene una secuencia aminoacídica identificada como SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9 o SEQ ID NO. 10, es un fragmento de dichas secuencias, o es un péptido o polipéptido que exhibe al menos una identidad del 70 % con dichas secuencias.

15 12. Uso de un péptido de la proteína ribosomal P0 de ectoparásitos, correspondiente a la región entre los aminoácidos 267 y 301 de dicha proteína, en la fabricación de una composición vacunal para el control de las infestaciones por ectoparásitos o la transmisión de los patógenos asociados a los mismos.

20 13. El uso de la reivindicación 12 donde dicho péptido tiene una secuencia aminoacídica identificada como SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9 o SEQ ID NO. 10, es un fragmento de dichas secuencias, o es un péptido o polipéptido que exhibe al menos una identidad del 70 % con dichas secuencias.

25 14. El uso de la reivindicación 12 donde la composición vacunal se administra por inyección, en un rango de 0,001-25 µg de péptido/g de peso del animal vacunado; mediante formulaciones de pienso en un rango de 0,01-300 µg de péptido/g de pienso o mediante baños de inmersión para peces en un rango de 0,01-10 mg de péptido/L de agua.

Figura 1

Grado de accesibilidad

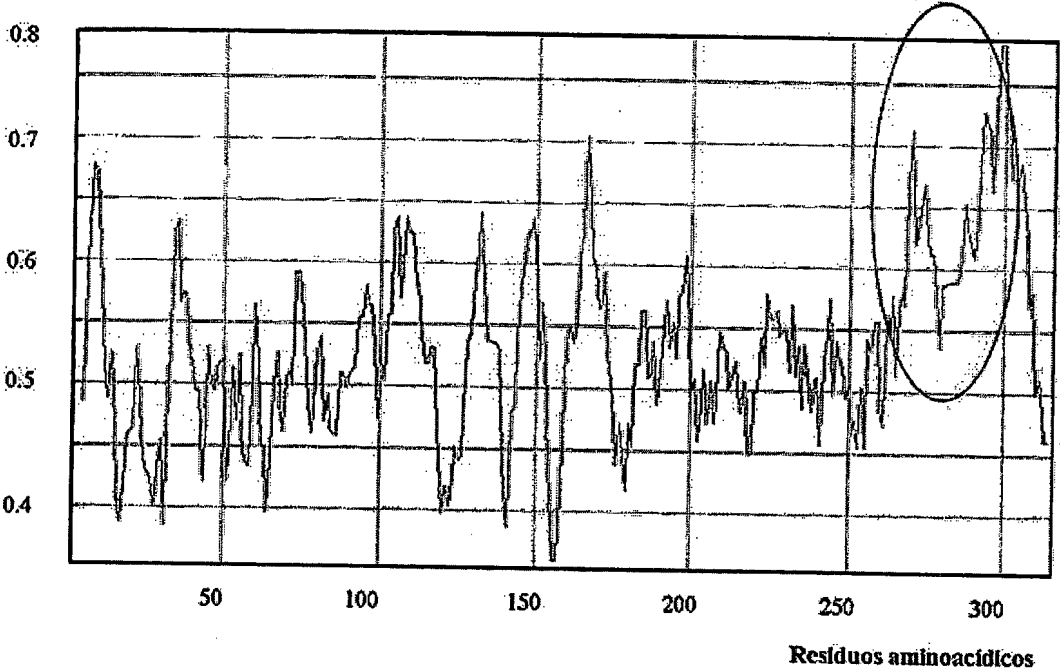


Figura 2

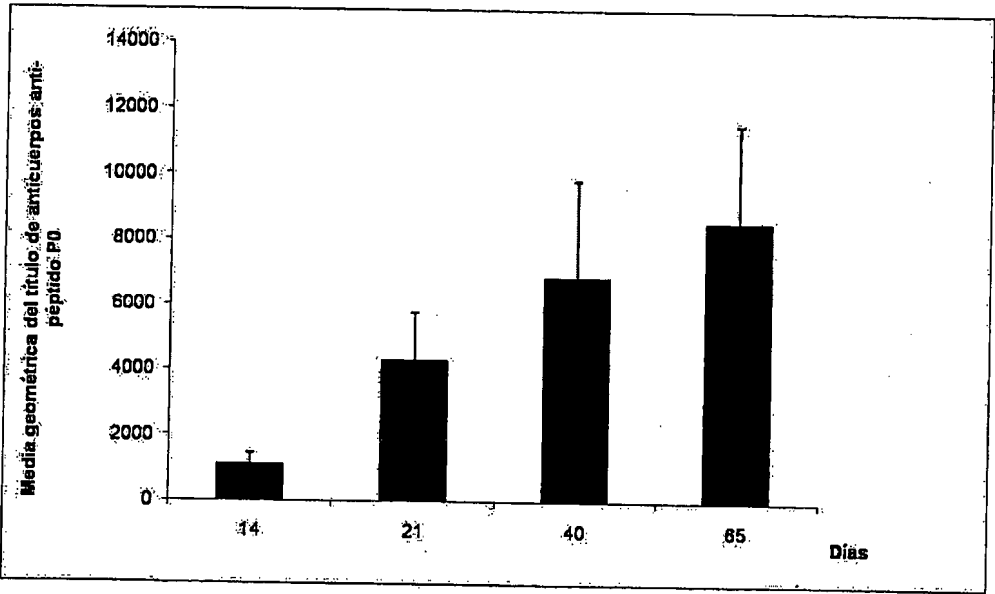


Figura 3

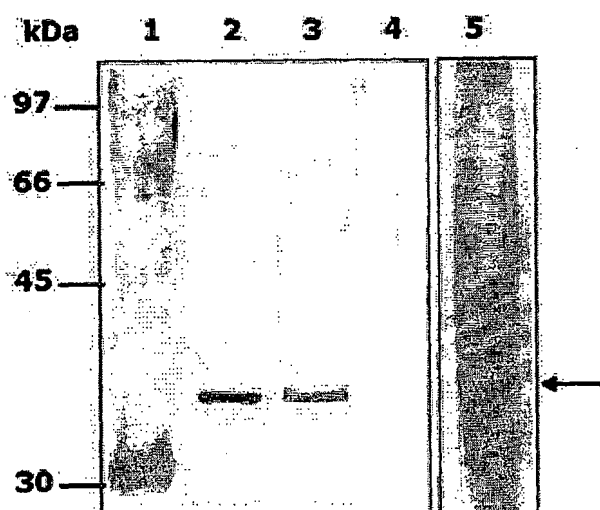


Figura 4

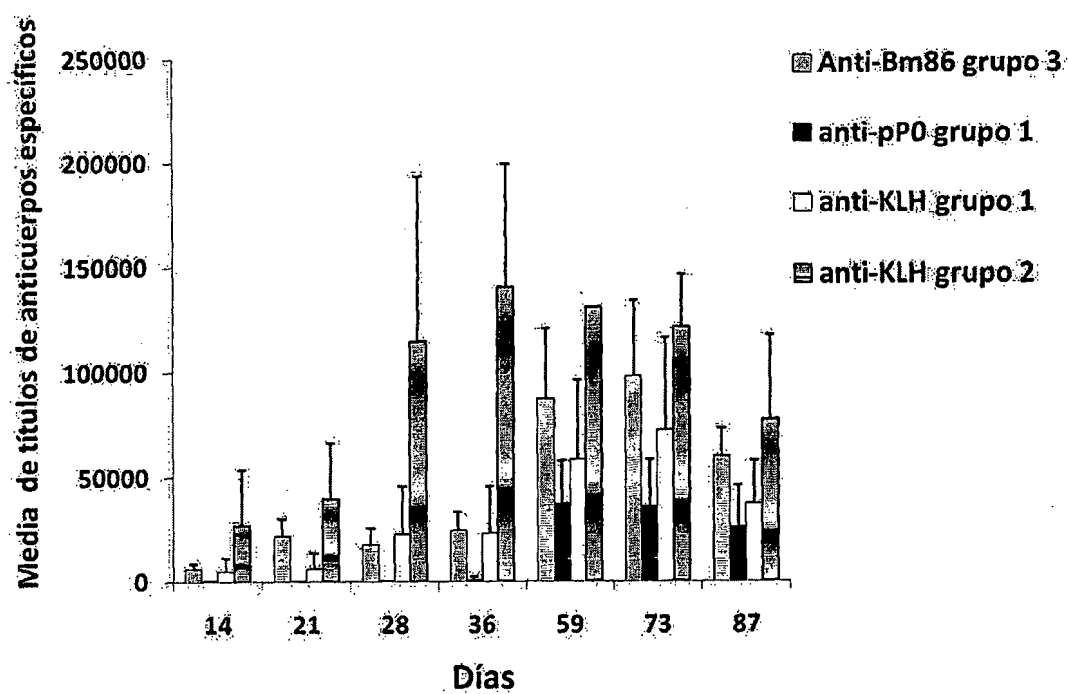


Figura 5

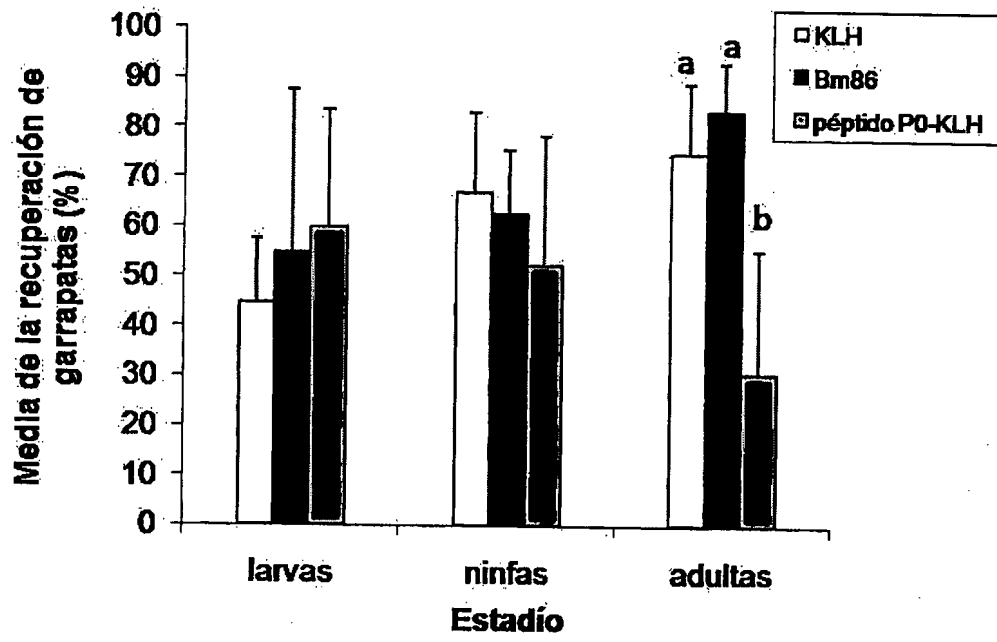


Figura 6

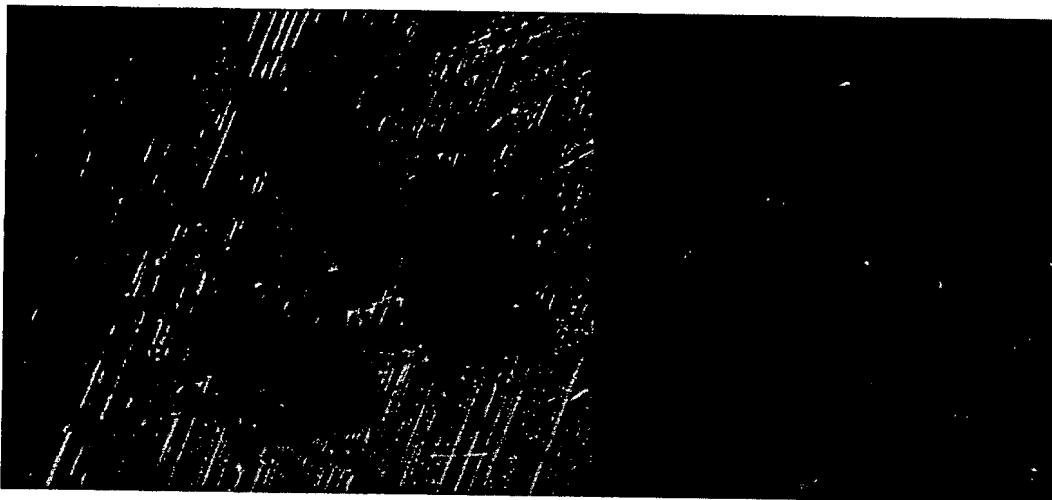


Figura 7

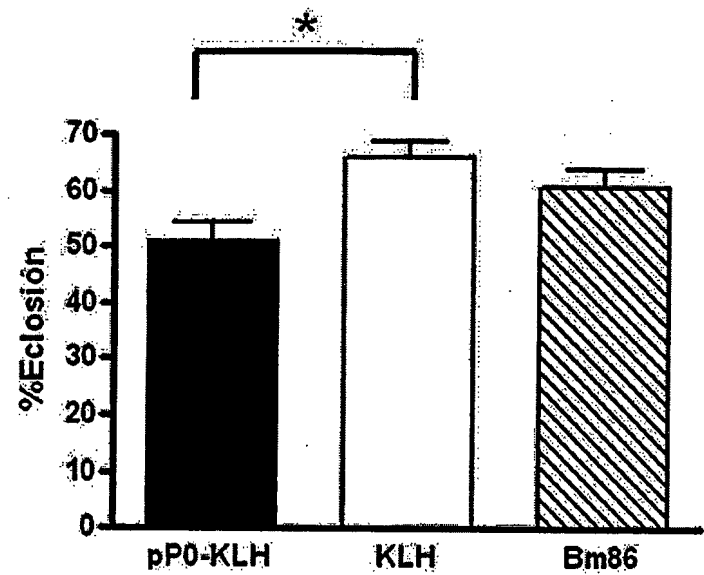
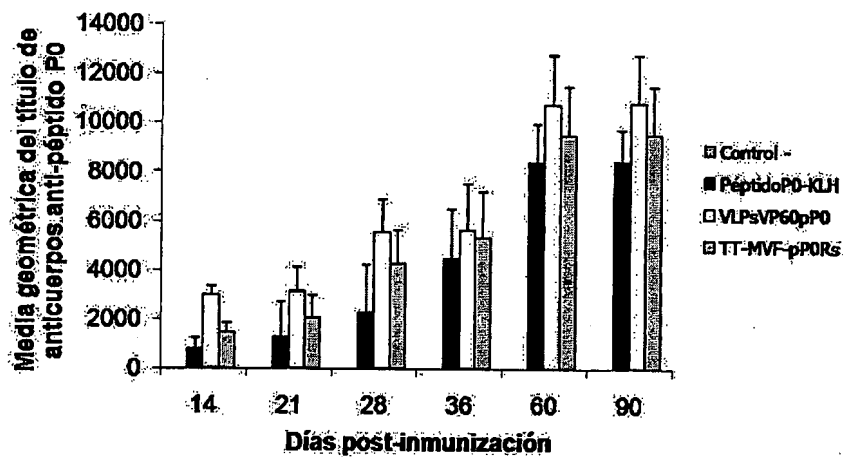


Figura 8

A



B

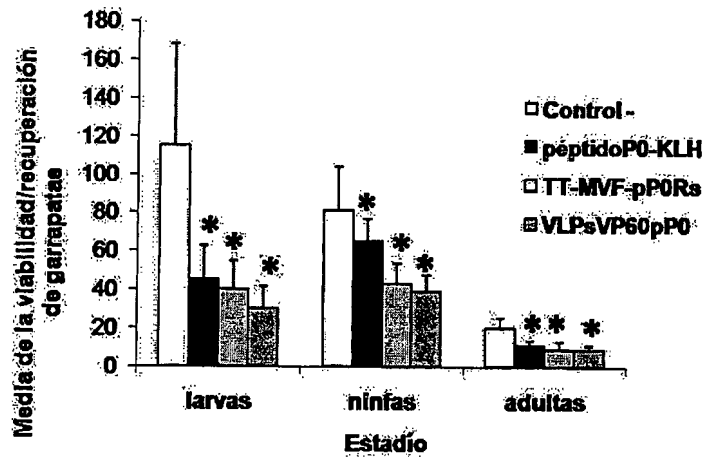


Figura 9

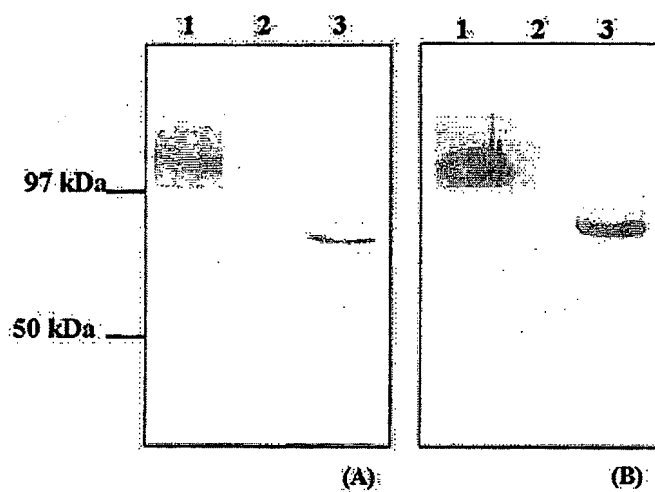


Figura 10

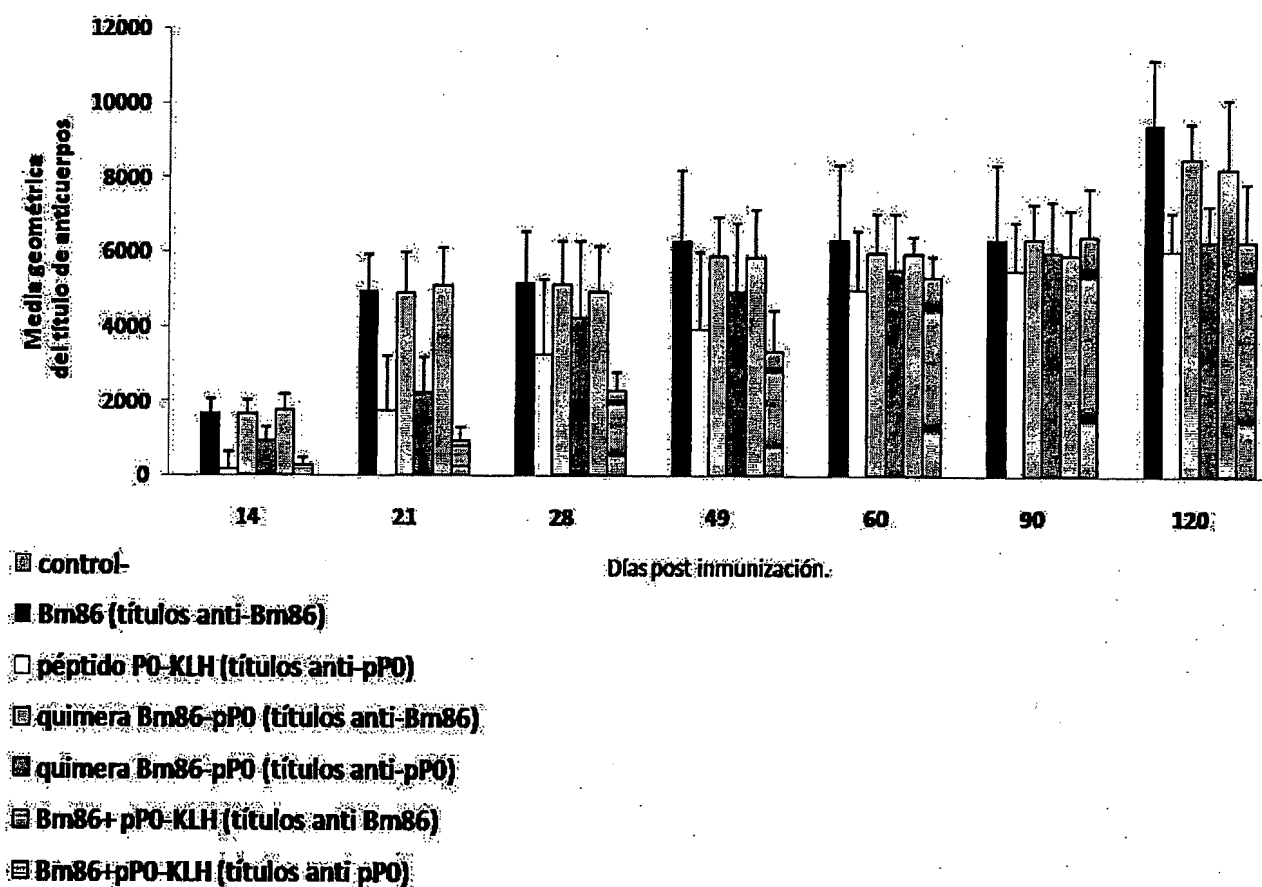


Figura 11

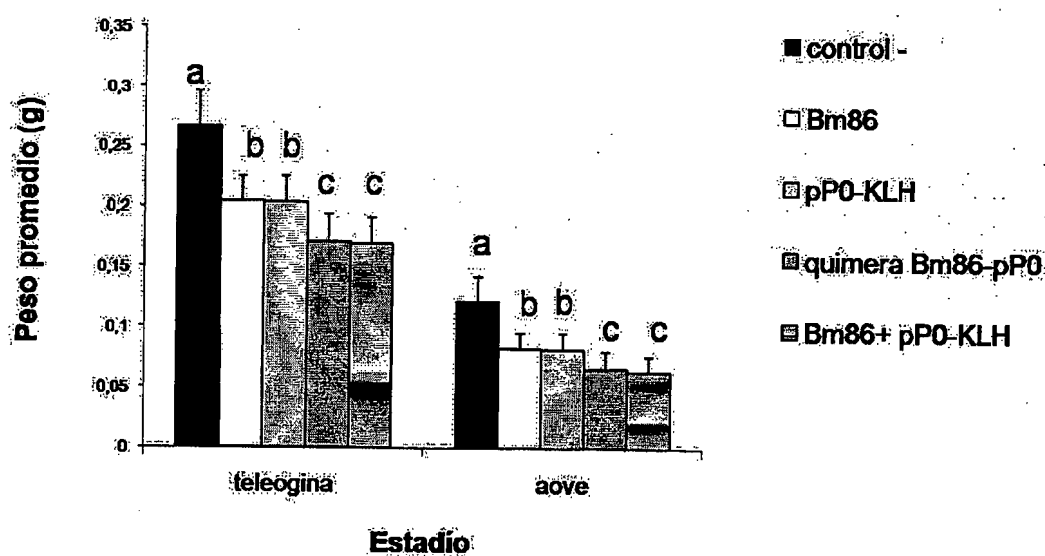


Figura 12

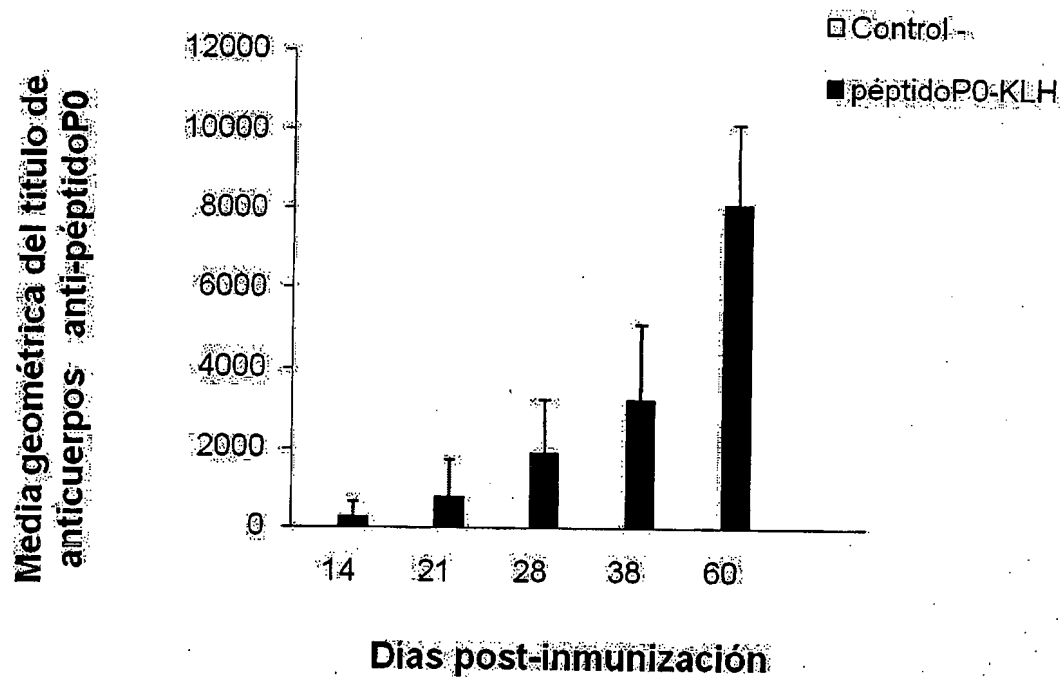
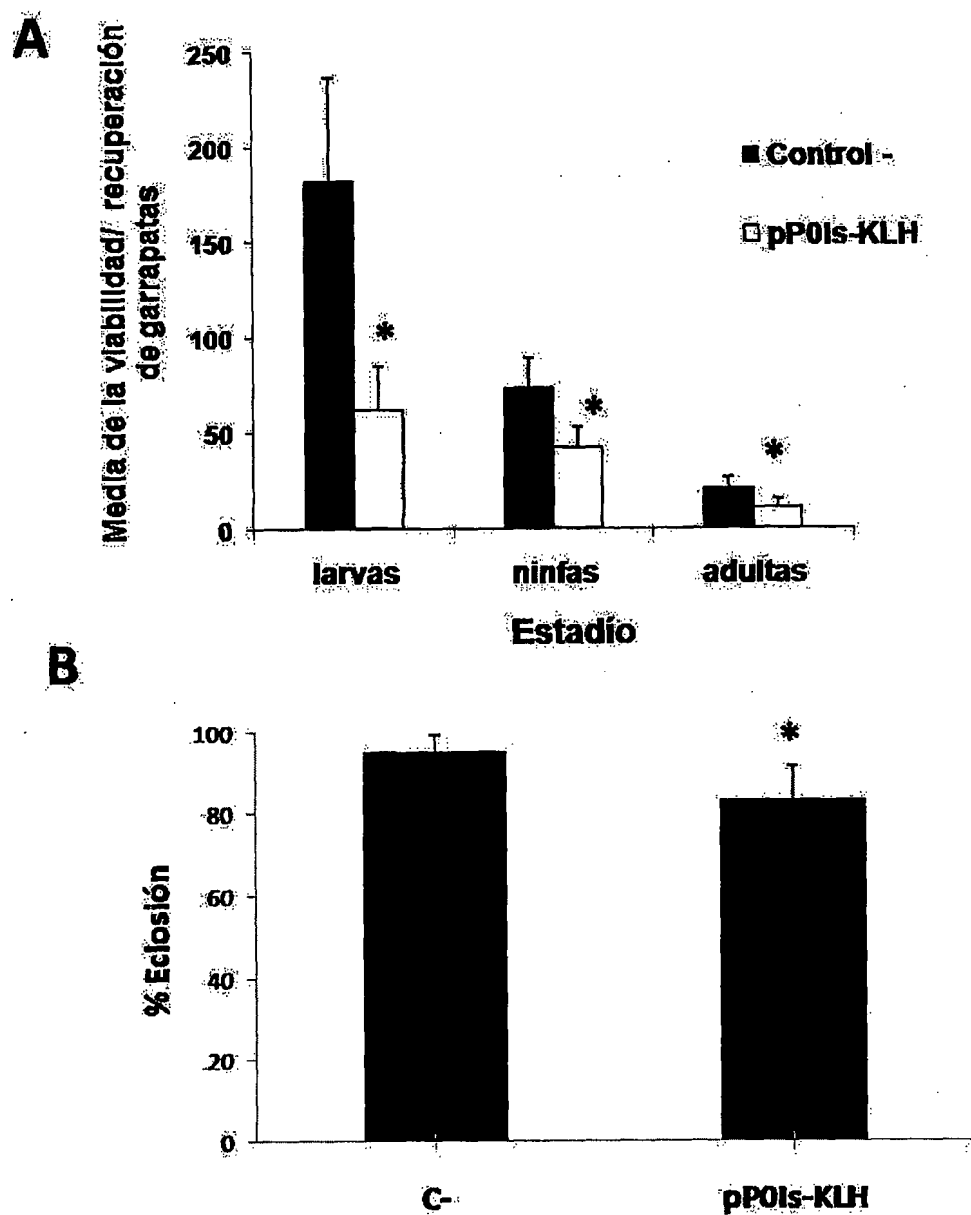


Figura 13



DET/000005

1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

<120> COMPOSICION VACUNAL PARA EL CONTROL DE LAS
INFESTACIONES POR ECTOPARÁSITOS

<130> vac ectoparásitos

<140>

<141>

<150> 2010-0188

<151> 2010-28-09

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 957

<212> ADN

<213> Rhipicephalus microplus

<400> 1

```

atggtcaggg aggataagac gacctggaag agcaactact tcctgcgact ggtgcagctg 60
ctcgacgagt accccaagtg cttcatcgtg ggtgtagaca atgtcggctc gaagcagatg 120
cagacgatcc gtgtttcgct ccgcaagcac gccgtcctgc tcatgggcaa gaacaccatg 180
atccgcaagg ccatccgcgg acacctggac aacaaccgg ccctggagaa gctgttgccg 240
cacatcaagg gcaacgtcgg tttcgttttc accaaggaag acctgactga ggtgcgcgag 300
aagatcatcg acaacaaggt gaaggcgct gccgtgctg gtgccctcgc cccctggat 360
gtcatgatcc cggctcagaa cactggcctc ggccccgaga agacctctt cttccaggcc 420
ctgcagattc ccaccaagat ctcaaaggtt actattgaaa ttctcaacga gatccatttg 480
atcaagaagg atgaccgtgt cgggtgcttc gaggtacgc ttctaaacat gttgaacatc 540
tcgcccttct catatggtct gaagatcctg caggtgtacg actcgggtac tgtcttctcc 600
cctgacatct tggacatcac accagaggac ctgcgatcag cgtttgtga ggggtgccgc 660
aatgttgctg ccgtatcctt gtccatcgga tacccgactg ttgcatcagt cccacactcc 720
attgtcaatg gtctcaagaa cctcattgcc attgctgtgg agaccgacat tacattcaag 780
gaggctgaaa tggccaagga gtacctcaag gaccgcgcga agttcgctgc agcagcagct 840
ccagccgcag ggggtggggc agctgcagcc aagccggagg agtcgaagaa ggaagaagcc 900
aagaaggagg aatccgaaga ggaggacgac gatatgggt tcggactctt cgactag 957

```

<210> 2

<211> 957

<212> ADN

<213> Rhipicephalus sanguineus

<400> 2

```

atggtcaggg aggataagac gacctggaag agcaactact tcctgcggct ggtgcagctg 60
ctcgacgagt accccaagtg cttcatcgtg ggctcgaca atgtcggctc gaagcagatg 120
cagacgatcc gtgtttcgct ccgcaagcac gccgtcctgc tcatgggcaa gaacaccatg 180
atccgcaagg ccatccgcgg acacctggac aacaaccgg ccctggaaaa gctgttgcca 240
cacatcaagg gcaacgtcgg tttcgtcttc accaaggaag acctgacaga ggtgcgtgag 300
aagatcattg acaacaaggt gaaggcgct gccgtgccc gtgccctggc cctctggac 360
gtcatgatcc cggcgagaa caccggcctc ggtcccaga agacctctt cttccaggcc 420
ctgcagatcc ccaccaagat ctgaaggtt accattgaaa ttctcaatga gatccattg 480

```

pat/002011/000005

```

atcaagaagg acgacagggg gggcgcttcc gagggccacgc ttctcaacat gttgaacatc 540
tcgcccttct cgtatgggtct gaagattctg caggtgtacg actccggtac cgtgttctcc 600
cctgacattt tggacatcac accagaggac ttgagatcag cattcgtcga ggggtgtccgc 660
aatgtcgctg ctgtatcctt gtccatcgga tacccgactg ttgcatcagt cccacactcc 720
attgtcaacg gtctcaagaa cctcattgcc attgccgtgg agacagacat cacgttcaag 780
gaggctgaaa tggccaagga gtacctcaag gacccgtcga agttcgctgc agcagcagct 840
ccagccgcag gaggtggggc agccgcagcc aagccggagg agtcgaagaa ggaagaagct 900
aagaaggagg aatccgaaga ggaggacgac gatatgggct tcggactctt cgactag 957

```

<210> 3
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> Rhipicephalus microplus

<400> 3

Met	Val	Arg	Glu	Asp	Lys	Thr	Thr	Trp	Lys	Ser	Asn	Tyr	Phe	Leu	Arg
1				5					10					15	
Leu	Val	Gln	Leu	Leu	Asp	Glu	Tyr	Pro	Lys	Cys	Phe	Ile	Val	Gly	Val
			20					25						30	
Asp	Asn	Val	Gly	Ser	Lys	Gln	Met	Gln	Thr	Ile	Arg	Val	Ser	Leu	Arg
		35					40					45			
Lys	His	Ala	Val	Leu	Leu	Met	Gly	Lys	Asn	Thr	Met	Ile	Arg	Lys	Ala
	50					55					60				
Ile	Arg	Gly	His	Leu	Asp	Asn	Asn	Pro	Ala	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Pro
65				70					75						80
His	Ile	Lys	Gly	Asn	Val	Gly	Phe	Val	Phe	Thr	Lys	Glu	Asp	Leu	Thr
			85					90						95	
Glu	Val	Arg	Glu	Lys	Ile	Ile	Asp	Asn	Lys	Val	Lys	Ala	Pro	Ala	Arg
			100					105					110		
Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Pro	Leu	Asp	Val	Met	Ile	Pro	Ala	Gln	Asn	Thr
		115					120					125			
Gly	Leu	Gly	Pro	Glu	Lys	Thr	Ser	Phe	Phe	Gln	Ala	Leu	Gln	Ile	Pro
130						135					140				
Thr	Lys	Ile	Ser	Lys	Gly	Thr	Ile	Glu	Ile	Leu	Asn	Glu	Ile	His	Leu
145					150					155					160
Ile	Lys	Lys	Asp	Asp	Arg	Val	Gly	Ala	Ser	Glu	Ala	Thr	Leu	Leu	Asn
			165						170					175	
Met	Leu	Asn	Ile	Ser	Pro	Phe	Ser	Tyr	Gly	Leu	Lys	Ile	Leu	Gln	Val
		180						185					190		
Tyr	Asp	Ser	Gly	Thr	Val	Phe	Ser	Pro	Asp	Ile	Leu	Asp	Ile	Thr	Pro
	195						200					205			
Glu	Asp	Leu	Arg	Ser	Ala	Phe	Val	Glu	Gly	Val	Arg	Asn	Val	Ala	Ala
210					215						220				

DET/000011/000005

3

Val Ser Leu Ser Ile Gly Tyr Pro Thr Val Ala Ser Val Pro His Ser
225 230 235 240

Ile Val Asn Gly Leu Lys Asn Leu Ile Ala Ile Ala Val Glu Thr Asp
245 250 255

Ile Thr Phe Lys Glu Ala Glu Met Ala Lys Glu Tyr Leu Lys Asp Pro
260 265 270

Ser Lys Phe Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Ala Ala Lys Pro Glu Glu Ser Lys Lys Glu Glu Ala Lys Lys Glu Glu
290 295 300

Ser Glu Glu Glu Asp Asp Asp Met Gly Phe Gly Leu Phe Asp
305 310 315

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Rhipicephalus sanguineus

<400> 4

Glu Tyr Leu Lys Asp Pro Ser Lys Phe Ala Ala Ala Ala Pro Ala
1 5 10 15

Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Lys Pro Glu Glu Ser Lys Lys Glu
20 25 30

Glu Ala Lys
35

<210> 5

<211> 1953

<212> ADN

<213> Rhipicephalus microplus

<400> 5

atgcgtggca tgcgtttggt cgtcgccgct gtttcaactga ttgtagaggg cacagcagaa 60
tcatccattt gctctgactt cgggaacgag ttctgtcgca acgctgaatg tgaagtgggtg 120
cctggtgcag aggatgattt cgtgtgcaaa tgccgcgag ataatatgta cttcaatgct 180
gctgaaaagc aatgcgaata taaagatacg tgcaagacaa gggagtgcag ctatggacgt 240
tgcgttgaaa gtaacccgag caaggctagc tgcgtctgcg aagcatcgga cgatctaacg 300
ctacaatgca aaattaaaaa tgactacgca attgactgcc gaaaccgagg tggcactgct 360
aagttgcgca cggatgggtt tattggcgca acgtgtgact gtggtgaatg ggggtgcgatg 420
aacatgacca cccggaactg tgtccctacc acgtgtcttc gtcccgaactt gacctgcaaa 480
gacctctgcg agaaaaacct gtttcaaagg gattctcggt gttgccaggg gtggaacaca 540
gcaaactggt cagccgctcc tccagctgac tctattgct ctctggggag ccccaaagga 600
ccggacggac agtgtataaa tgcttgcaag acgaaagaag ctgggtttgt ctgcaagcat 660
ggatgcaggc cgaccggcaa ggcgtacgag tgcacgtgcc cgagtggctc taccgtcgcc 720
gaagatggca ttacctgcaa aagtatttcg cacacagtca gctgcactgc tgagcaaaaa 780
cagacctgcc gcccaaccga agactgtcgt gtgcacaaag gaactgtgtt gtgtgagtgc 840
ccgtggaatc aacatctagt gggggacacg tgcataagtg attgcgtcga caagaaatgc 900
cacgaagaat ttatggactg tggcgtatat atgaatcgac aaagctgcta ttgtccatgg 960
aatcaagga agccggggccc aaatgtcaac atcaatgaat gcctactgaa tgagtattac 1020

```

tacacggtgt cattcacccc aaacatatct tttgattctg accattgcaa atggtatgag 1080
gatcgtgttt tggaagcgat acggaccagt atcggaagag aagtttttaa ggttgagata 1140
cttaactgca cgcaggacat taaggcaaga ctcatagcag agaaaccact gtcaaaacac 1200
gtgctcagga aactacaagc atgcgagcat ccaatcggcg aatggtgcat gatgtatccg 1260
aagttgctga tcaagaaaaa ctctgcaaca gaaatogaag aagagaacct ttgcgacagt 1320
ctgctcaagg atcaggaagc tgcctacaaa ggtcaaaaca aatgcgtcaa ggtcgacaac 1380
ctcttctggt tccagtgcgc tgatgggttac acaacaactt acgagatgac acgaggtcgc 1440
ctacgccgct ccgtgtgtaa agctggagtt tcttgcaacg aaaacgagca gtcggagtgt 1500
gctgacaaaag ggcaaattatt tgtttacgaa aacggcaaag cgaattgccca atgcccacca 1560
gacactaaac ctgggggagat tggctgcatt gagcgtacca catgcaaccc taaagaaata 1620
caagaatgcc aagacaagaa gctggagtgct gtttacaaaa accataaagc agaatgctgag 1680
tgtcctgatg atcacgagtg ttacagggag cctgccaaaag actcttgtag tgaagaggat 1740
aatggtaaat gtcaaagcag tgggcagcgt tgtgtaatag aaaacggaaa ggctgtttgc 1800
aaggaaaagt ctgaagcaac aacagctgcg actacaacaa cgaaagcgaa agacaaggat 1860
ccagatcctg gaaagtcaag tgctgcagca gtatcagcta ctgggctctt gttactgctc 1920
gcagctactt cagtcaccgc agcatcgttg taa 1953

```

<210> 6
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Ixodes scapularis

<400> 6
 Glu Tyr Leu Lys Asp Pro Ser Lys Phe Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Pro Ala Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Lys Pro Asp Ala Lys Lys
 20 25 30
 Glu Glu Ala Lys
 35

<210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido
 químérico que comprende los aminoácidos 282-301
 de la proteína ribosomal P0 y epitopos T

<400> 7
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val Ala Ala
 20 25 30
 Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Lys Pro Glu Glu Ser Lys Lys Glu Glu
 35 40 45
 Ala Lys Ala Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Lys Pro Glu Glu Ser
 50 55 60

207/ed2011/000005

5

Lys Lys Glu Glu Ala Lys Ala Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Lys
65 70 75 80

Pro Glu Glu Ser Lys Lys Glu Glu Ala Lys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn
85 90 95

Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val
100 105 110

Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val
115 120

<210> 8

<211> 34

<212> PRT

<213> Caligus clemensi

<400> 8

Ala Tyr Leu Glu Asp Pro Ser Lys Phe Ala Val Ala Ala Ala Pro Ala
1 5 10 15

Ala Gly Asn Ala Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ala Lys Val Glu Glu
20 25 30

Pro Glu

<210> 9

<211> 35

<212> PRT

<213> Lepeophtheirus salmonis

<400> 9

Glu Tyr Leu Ala Asp Pro Ser Lys Phe Ala Ser Val Ala Ala Ala Pro
1 5 10 15

Ala Ala Gly Ala Thr Lys Ala Ala Ala Ala Pro Ala Lys Ala Asp
20 25 30

Glu Pro Glu
35

<210> 10

<211> 36

<212> PRT

<213> Caligus rogercresseyi

<400> 10

Glu Tyr Leu Lys Asp Pro Ser Lys Phe Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ala
1 5 10 15

Ala Ser Gly Gly Gly Ala Ala Thr Lys Ala Ala Ala Pro Ala Lys Ala
20 25 30

Glu Glu Pro Glu
35

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4ª N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

Para patentes, modelos de utilidad y diseños industriales, marcas de fábrica y de servicio, nombres comerciales, enseñas y lemas comerciales.

RATIFICACION, REPRESENTACION Y PODER

8972

5917

La que suscribe, CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA,

sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Cuba,

domiciliada en 31 Street 1/150 & 190, Cubanacan, Playa, Habana, Cuba,

por el presente ratificamos la solicitud de patente No. 97.057.986

presentada por EMILIO FERRERO el 3 de octubre de 1997

ante la Superintendencia de Industria y Comercio en Bogotá, Colombia,

y nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como nuestros representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, conferimos poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de nuestra propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizamos a los dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, renuncia voluntaria, y registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Firmado en la ciudad de La Habana

el 19 de noviembre de 1997

Dr. Manuel de Jesús Limonta Vidal



© CAVELIER ABOGADOS

WPPODERE-23 (MINUTA N° 12.1.1.1.4.2)

LIC. Carmen Alicia Pérez Díaz
Notario de la Notaría Especial a cargo
de la Dirección de Registro y Notarías
del Ministerio de Justicia de la República
de Cuba.

DOY FE. Que la(s) firma(s) que
antecede(n) a este documento por la
señalada que preceden con la misma
que se ocumbran a usar en todos sus
actos.

La Habana, a los 19 días del mes
de noviembre de 1997

Para los países que no son parte del Protocolo Interamericano de 1940 sobre Uniformidad del Régimen Legal de los Poderes, el Cónsul Colombiano debe certificar como sigue*:

Fecha:

Nº _____

El suscrito CONSUL DE COLOMBIA en

CERTIFICA:

1º Que el señor
quien autentica el documento anterior, ejercía legalmente en la fecha allí indicada, las funciones de

y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.

2º Que tuvo a la vista las pruebas de que la Compañía

que actualmente ejerce su objeto social y;

existe legalmente, y

3º Que el señor
quien firmó la representación y poder que preceden en su carácter de
de la Compañía
está autorizado para representarla en este acto, y otorgar el poder.

Cónsul de Colombia

* Son parte del Protocolo: Colombia, El Salvador, México, Venezuela y los Estados Unidos. En los demás países el Señor Cónsul de Colombia debe otorgar el certificado según el modelo de esta página.

FECHA

No.

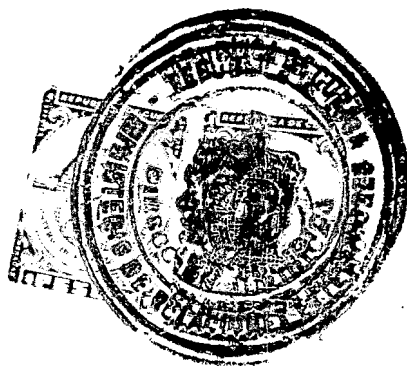
El suscrito CONSUL DE COLOMBIA en

C E R T I F I C A :

- 1o. Que el señor
quien autoriza el documento anterior, ejercía legalmente
en la fecha allí indicada, las funciones de
y que la firma
y sello que en el documento aparecen como suyos son los que
usa y acostumbra en sus actos oficiales.
- 2o.) Que tuvo a la vista las pruebas de que la Compañía
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA,
domiciliada en 31 Street 1/156 & 190, Cubanacan, Playa,
Habana, Cuba,
existe legalmente y que actualmente ejerce su objeto social
de acuerdo con las leyes del respectivo país.
- 3o.) Que el señor , quien
firmó el poder que precede en su carácter de
está autorizado para
representarla en este acto y otorgar el poder.

DERECHOS USS

CONSUL



REPUBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCION JURIDICA

José D. Peraza Chapeau, /o Julio P. Alvarez Dorla
/o Orlando F. Acosta Faz, /o María Silvia Fernán-
dez Villar, /o Aida de Puzo Pedraza, /o Manuel
Capaz Ruiz, /o Jesús Fernández Ponce. Funciona-
rios autorizados para certificar Autenticaciones
de firma en Documentos expedidos para surtir
efectos en el extranjero.

CERTIFICO: QUE AL PARECER ES AUTENTICA DEL
FUNCIONARIO AUTORIZANTE DE ESTE DOCUMENTO,
LA FIRMA QUE ANTECEDE, POR LA SEMEJANZA QUE
GUARDA CON LA QUE OBRA REGISTRADA EN ESTE
CENTRO COMO LA QUE EL MISMO ACOSTUMBRA A
USAR EN SUS ACTOS OFICIALES.

EN FE DE LO CUAL AUTORIZO LA PRESENTE CON LA
FIRMA Y EL SELLO DE ESTE MINISTERIO.

LA HABANA

26 NOV 1997



Consulado General de Colombia

LA HABANA, CUBA

No. 67/97

La Habana, Diciembre 26 de 1997

Ea suscrita Cónsul General de Colombia, vistos los documentos presentados por los interesados, **CERTIFICA:**

Que el Señor Jesús Fernández Ponce, quien como funcionario de la Dirección Jurídica del Ministerio de Relaciones Exteriores de la República de Cuba autenticó la firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado; Que el CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA es una unidad presupuestada constituida de acuerdo con las leyes de Cuba y cumple su objeto conforme a las mismas; Que el Señor Manuel de Jesús Limonta Vidal, quien en su carácter de Director de la citada unidad presupuestada confiere el poder precedente, es su representante legal en este país.

La Cónsul General de Colombia no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

Martha N. de Stand

Martha Niño de Stand.
Consul General

PAGADOS

IMPUESTO DE TIMBRE NACIONAL	US\$ 6,00 (seis dólares)
DERECHOS FONDO ROTATORIO	US\$ 100.00 (cien dólares)
TOTAL PAGADO	US\$ 106.00 (cientoseis dólares)

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

[Signature]
202496

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1998 ENE 13 12 12

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

COPIA DE LA FIRMA DEL SEÑOR [illegible]

56

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : **CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y
BIOTECNOLOGIA**

Poder conferido el : 19/11/1997

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ

RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D.C.

Año mil AMPARO QUINTERO ARTURO

22 OCT 2009

NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE

BOGOTÁ, D.C.

Comparecieron:

Emilio Fariñas
Williamson Fariñas
Diego Suarez Riquelme

Quien(es) exhibió(ron) la(s) C.C.

438019 TP 21929

35406344 TP 23555

Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que ap(arece)n

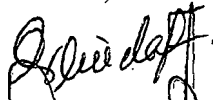
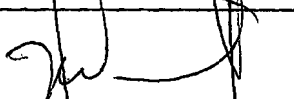
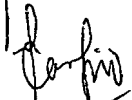
en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y

que el contenido del mismo es cierto.

En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Fariñas
Diego Suarez Riquelme



VIII-2-1	Declaración: Derecho para solicitar y que sea concedida una patente Declaración sobre el derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, para solicitar y que le sea concedida una patente (Reglas 4.17.ii) y 51bis.1.a)ii)), en caso de que no proceda la declaración según la Regla 4.17.iv): Nombre (APELLUDOS, Nombre)	Respecto de esta solicitud internacional CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA tiene derecho a solicitar y a que le sea concedida una patente en virtud de lo siguiente:
VIII-2-1(i)v)		una cesión de RODRIGUEZ MALLON, Alina a CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA, datado 14 Septiembre 2011 (14.09.2011)
VIII-2-1(i)v)		una cesión de FERNANDEZ DIAZ, Erlinda a CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA, datado 14 Septiembre 2011 (14.09.2011)
VIII-2-1(i)v)		una cesión de ESTRADA GARCIA, Mario, Pablo a CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA, datado 14 Septiembre 2011 (14.09.2011)
VIII-2-1(i)v)		una cesión de CARPIO GONZALEZ, Yamila a CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA, datado 14 Septiembre 2011 (14.09.2011)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0038045
		Bogotá D.C., Abril 23 de 2013 - 16:18:43

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	196871850	23/04/2013	11.238.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	
			Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
			500.000.00 500.000.00
			<u>\$500.000.00</u>
			=====

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
--
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-105202- -00000-0000
Fecha: 2013-04-25 11:25:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 60

0610-08972-841-008-8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0038428

Bogotá D.C., Abril 24 de 2013 - 12:10:34

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	35693	16/04/2013		15.000.00
RECIBO DE CA	999999999	35750	16/04/2013		103.000.00
RECIBO DE CA	999999999	35845	16/04/2013		1.000.00
RECIBO DE CA	999999999	35846	16/04/2013		1.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
4 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	120.000.00
			\$120.000.00

SON: **CIENTO VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-105202- -00000-0000

Fecha: 2013-04-25 11:25:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 60

Colo -08972-841-008-8

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Abril 24 de 2013 - 12:10:34

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD FASE NACIONAL PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 039/000	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 2010-0188	(32) Fecha 2010/09/28	(33) País CU
		(72) Inventor(es) ALINA RODRIGUEZ MALLON Y OTROS	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 2013/04/28		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 2012/04/05
	Fecha de presentación de la solicitud: 2011/09/26		N° publicación: WO 2012/041260 A1
	No. de solicitud PCT/CU2011/000005		
(54) Titulo: COMPOSICION VACUNAL PARA EL CONTROL DE LAS INFESTACIONES POR ECTOPARÁSITOS			

Resumen:

La presente invención se relaciona con el uso de un péptido de la proteína ribosomal P0 en la fabricación de una composición vacunal para el control de las infestaciones por ectoparásitos y, por consiguiente, de la transmisión de sus patógenos asociados. Dicho péptido se localiza entre los aminoácidos 267 y 301 de la proteína P0, y puede ser obtenido por vía recombinante o mediante síntesis química. Dicho péptido puede ser fusionado a una proteína o péptido portador, o a un inmunopotenciador y ser incluido en una formulación oleosa. Las formulaciones vacunales que comprenden dicho péptido confieren protección contra las garrapatas y los ectoparásitos conocidos como "piojos de mar", sin que ocurra generación de autoinmunidad en el organismo hospedante. Entre dichas garrapatas se pueden mencionar las especies *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Ixodes scapularis*, y entre los piojos de mar se encuentran aquellos de los géneros *Caligus* y *Lepeophtheirus*.



No. 13-105202- -00000-0000

ONES

Fecha: 2013-04-25 11:25:23

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 60

86/00

PATENTE DE INVENCION ☐

MO

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

<120> COMPOSICION VACUNAL PARA EL CONTROL DE LAS
INFESTACIONES POR ECTOPARÁSITOS

<130> vac ectoparásitos

<140>

<141>

<150> 2010-0188

<151> 2010-28-09

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 957

<212> ADN

<213> Rhipicephalus microplus

<400> 1

```
atgggtcaggg aggataagac gacctggaag agcaactact tcctgcgact ggtgcagctg 60
ctcgacgagt accccaagtg cttcatcgtg ggtgtagaca atgtcggctc gaagcagatg 120
cagacgatcc gtgtttcgct ccgcaagcac gccgtcctgc tcatgggcaa gaacaccatg 180
atccgcaagg ccatccgcgg acacctggac aacaaccggg ccctggagaa gctgttgccg 240
cacatcaagg gcaacgtcgg tttcgttttc accaaggaag acctgactga ggtgcgcgag 300
aagatcatcg acaacaaggt gaaggcgctt gcccgctggt gtgccctcgc cccctgggat 360
gtcatgatcc cggctcagaa cactggcctc ggccccgaga agacctcttt cttccaggcc 420
ctgcagattc ccaccaagat ctcaaagggt actattgaaa ttctcaacga gatccatttg 480
atcaagaagg atgaccgtgt cgggtgcttc gaggtacgc ttctaaacat gttgaacatc 540
tcgcccttct catatggtct gaagatcctg cagggtgtac actcgggtac tgtcttctcc 600
cctgacatct tggacatcac accagaggac ctgcgatcag cgtttggtga ggggtgtccgc 660
aatgttgctg cgtatcctt gtccatcgga taccgactg ttgcatcagt cccacactcc 720
attgtcaatg gtctcaagaa cctcattgcc attgctgtgg agaccgacat tacattcaag 780
gaggctgaaa tggccaagga gtacctcaag gaccgcgcga agttcgtctg agcagcagct 840
ccagccgcag ggggtggggc agctgcagcc aagccggagg agtcgaagaa ggaagaagcc 900
aagaaggagg aatccgaaga ggaggacgac gatatgggct tcggactctt cgactag 957
```

<210> 2

<211> 957

<212> ADN

<213> Rhipicephalus sanguineus

<400> 2

```
atgggtcaggg aggataagac gacctggaag agcaactact tcctgcggtt ggtgcagctg 60
ctcgacgagt accccaagtg cttcatcgtg ggcgtcgaca atgtcggttc gaagcagatg 120
cagacgatcc gtgtttcgct ccgcaagcac gccgtcctgc tcatgggcaa gaacaccatg 180
atccgcaagg ccatccgcgg acacctggac aacaaccggg ccctggaaaa gctgttgcca 240
cacatcaagg gcaacgtcgg tttcgtcttc accaaggaag acctgacaga ggtgcgtgag 300
aagatcattg acaacaaggt gaaggcgctt gcccgctgcc gtgccctggc cctcttgga 360
gtcatgatcc cggcgcagaa caccggcctc ggtccccgaga agacctcttt cttccaggcc 420
ctgcagatcc ccaccaagat ctogaagggt accattgaaa ttctcaatga gatccacttg 480
```

atcaagaagg acgacagggt gggcgcttcc gaggccacgc ttctcaacat gttgaacatc 540
 tcgcccttct cgtatggtct gaagattctg caggtgtacg actccggtac cgtgttctcc 600
 cctgacattt tggacatcac accagaggac ttgagatcag cattcgctga ggggtgtccgc 660
 aatgtcgctg ctgtatcctt gtccatcgga taccgcactg ttgcatcagt cccacactcc 720
 attgtcaacg gtctcaagaa cctcattgcc attgccgtgg agacagacat cacgttcaag 780
 gaggtgaaa tggccaagga gtacctcaag gaccgcgtga agttcgctgc agcagcagct 840
 ccagccgcag gaggtggggc agccgcagcc aagccggagg agtcgaagaa ggaagaagct 900
 aagaaggagg aatccgaaga ggaggacgac gatatgggct tcggactctt cgactag 957

<210> 3

<211> 318

<212> PRT

<213> Rhipicephalus microplus

<400> 3

Met Val Arg Glu Asp Lys Thr Thr Trp Lys Ser Asn Tyr Phe Leu Arg
 1 5 10 15

Leu Val Gln Leu Leu Asp Glu Tyr Pro Lys Cys Phe Ile Val Gly Val
 20 25 30

Asp Asn Val Gly Ser Lys Gln Met Gln Thr Ile Arg Val Ser Leu Arg
 35 40 45

Lys His Ala Val Leu Leu Met Gly Lys Asn Thr Met Ile Arg Lys Ala
 50 55 60

Ile Arg Gly His Leu Asp Asn Asn Pro Ala Leu Glu Lys Leu Leu Pro
 65 70 75 80

His Ile Lys Gly Asn Val Gly Phe Val Phe Thr Lys Glu Asp Leu Thr
 85 90 95

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

Ala Gly Ala Leu Ala Pro Leu Asp Val Met Ile Pro Ala Gln Asn Thr
 115 120 125

Gly Leu Gly Pro Glu Lys Thr Ser Phe Phe Gln Ala Leu Gln Ile Pro
 130 135 140

Thr Lys Ile Ser Lys Gly Thr Ile Glu Ile Leu Asn Glu Ile His Leu
 145 150 155 160

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

Met Leu Asn Ile Ser Pro Phe Ser Tyr Gly Leu Lys Ile Leu Gln Val
 180 185 190

Tyr Asp Ser Gly Thr Val Phe Ser Pro Asp Ile Leu Asp Ile Thr Pro
 195 200 205

Glu Asp Leu Arg Ser Ala Phe Val Glu Gly Val Arg Asn Val Ala Ala
 210 215 220

Val Ser Leu Ser Ile Gly Tyr Pro Thr Val Ala Ser Val Pro His Ser
225 230 235 240

Ile Val Asn Gly Leu Lys Asn Leu Ile Ala Ile Ala Val Glu Thr Asp
245 250 255

Ile Thr Phe Lys Glu Ala Glu Met Ala Lys Glu Tyr Leu Lys Asp Pro
260 265 270

Ser Lys Phe Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Gly Ala Ala
275 280 285

Ala Ala Lys Pro Glu Glu Ser Lys Lys Glu Glu Ala Lys Lys Glu Glu
290 295 300

Ser Glu Glu Glu Asp Asp Asp Met Gly Phe Gly Leu Phe Asp
305 310 315

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Rhipicephalus sanguineus

<400> 4

Glu Tyr Leu Lys Asp Pro Ser Lys Phe Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala
1 5 10 15

Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Lys Pro Glu Glu Ser Lys Lys Glu
20 25 30

Glu Ala Lys
35

<210> 5

<211> 1953

<212> ADN

<213> Rhipicephalus microplus

<400> 5

atgcgtggca tcgctttgtt cgtcgccgct gtttcactga ttgtagaggg cacagcagaa 60
tcatccattt gctctgactt cgggaacgag ttctgtcgca acgctgaatg tgaagtgggtg 120
cctggtgcag aggatgattt cgtgtgcaaa tgccgcgag ataatatgta cttcaatgct 180
gctgaaaagc aatgcgaata taaagatacg tgcaagacaa gggagtgcag ctatggacgt 240
tgcgttgaaa gtaacccgag caaggctagc tgcgtctgcg aagcatcgga cgatctaacg 300
ctacaatgca aaattaaaaa tgactacgca attgactgcc gaaaccgagg tggcactgct 360
aagttgcgca cggatgggtt tattggcgca acgtgtgact gtggtgaatg ggggtgcgatg 420
aacatgacca cccggaactg tgtccctacc acgtgtcttc gtcccgaactt gacctgcaaa 480
gacctctgcg agaaaaacct gcttcaaagg gattctcgtt gttgccaggg gtggaacaca 540
gcaaaactgtt cagccgctcc tccagctgac tcctattgct ctctgggag ccccaaagga 600
ccggacggac agtgataaaa tgcttgcaag acgaaagaag ctgggtttgt ctgcaagcat 660
ggatgcaggt cgaccggcaa ggcgtacgag tgcacgtgcc cgagtggctc taccgtcgcc 720
gaagatggca ttacctgcaa aagtatttcg cacacagtca gctgcactgc tgagcaaaaa 780
cagacctgcc gcccaaccga agactgtcgt gtgcacaaag gaactgtgtt gtgtgagtgc 840
ccgtggaatc aacatctagt gggggacacg tgcataagtg attgcgtcga caagaaatgc 900
cacgaagaat ttatggactg tggcgtatat atgaatcgac aaagotgcta ttgtccatgg 960
aatcaagga agccggggccc aaatgtcaac atcaatgaat gcctactgaa tgagtattac 1020

```

tacacggtgt cattcacccc aaacatatct tttgattctg accattgcaa atggtatgag 1080
gatcgtgttt tggaagcgat acggaccagt atcggaagaa aagtttttaa gggtgagata 1140
cttaactgca cgcaggacat taaggcaaga ctcatagcag agaaaccact gtcaaaacac 1200
gtgctcagga aactacaagc atgcgagcat ccaatcggcg aatggtgcat gatgtatccg 1260
aagttgtcga tcaagaaaaa ctctgcaaca gaaatcgaag aagagaacct ttgcgacagt 1320
ctgctcaagg atcaggaagc tgcctacaaa ggtcaaaaaca aatgcgtcaa ggtcgacaac 1380
ctcttctggt tccagtgcgc tgatggttac acaacaactt acgagatgac acgaggtcgc 1440
ctacgccgct ccgtgtgtaa agctggagtt tcttgcaacg aaaacgagca gtcggagtgt 1500
gctgacaaag ggcaaattatt tgtttacgaa aacggcaag cgaattgcc aatgccacca 1560
gacactaaac ctggggagat tggctgcatt gagcgtacca catgcaaccc taaagaaata 1620
caagaatgcc aagacaagaa gctggagtgc gtttacaaaa accataaagc agaatgcgag 1680
tgtcctgatg atcacgagtg ttacagggag cctgccaaag actcttgca gtaagaggat 1740
aatggtaaat gtcaaagcag tgggcagcgt tgtgtaatag aaaacggaaa ggctgtttgc 1800
aagggaaagt ctgaagcaac aacagctgcg actacaacaa cgaaagcgaa agacaaggat 1860
ccagatcctg gaaagtcaag tgctgcagca gtatcagcta ctgggctctt gttactgctc 1920
gcagctactt cagtcaccgc agcatcgttg taa 1953

```

<210> 6
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Ixodes scapularis

<400> 6
 Glu Tyr Leu Lys Asp Pro Ser Lys Phe Val Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Pro Ala Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Lys Pro Asp Ala Lys Lys
 20 25 30
 Glu Glu Ala Lys
 35

<210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido
 quimérico que comprende los aminoácidos 282-301
 de la proteína ribosomal P0 y epitopos T

<400> 7
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val Ala Ala
 20 25 30
 Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Lys Pro Glu Glu Ser Lys Lys Glu Glu
 35 40 45
 Ala Lys Ala Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Lys Pro Glu Glu Ser
 50 55 60

Lys Lys Glu Glu Ala Lys Ala Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Lys
65 70 75 80

Pro Glu Glu Ser Lys Lys Glu Glu Ala Lys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn
85 90 95

Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val
100 105 110

Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val
115 120

<210> 8
<211> 34
<212> PRT
<213> Caligus clemensi

<400> 8
Ala Tyr Leu Glu Asp Pro Ser Lys Phe Ala Val Ala Ala Ala Pro Ala
1 5 10 15

Ala Gly Asn Ala Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ala Lys Val Glu Glu
20 25 30

Pro Glu

<210> 9
<211> 35
<212> PRT
<213> Lepeophtheirus salmonis

<400> 9
Glu Tyr Leu Ala Asp Pro Ser Lys Phe Ala Ser Val Ala Ala Ala Pro
1 5 10 15

Ala Ala Gly Ala Thr Lys Ala Ala Ala Ala Pro Ala Lys Ala Asp
20 25 30

Glu Pro Glu
35

<210> 10
<211> 36
<212> PRT
<213> Caligus rogercresseyi

<400> 10
Glu Tyr Leu Lys Asp Pro Ser Lys Phe Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ala
1 5 10 15

Ala Ser Gly Gly Gly Ala Ala Thr Lys Ala Ala Ala Pro Ala Lys Ala
20 25 30

Glu Glu Pro Glu
35