



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

| | | |
|----------------------------|--|---|
| Número de solicitud: | P201030847 | |
| Fecha de recepción: | 02 junio 2010, 13:59 (CEST) | |
| Oficina receptora: | OEPM Madrid | |
| Su referencia: | ES1641.758 | |
| Solicitante: | CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) | |
| Número de solicitantes: | 1 | |
| País: | ES | |
| Título: | ANTIGENO RECOMBINANTE DE LA GARRAPATA ORNITHODOROS MOUBATA | |
| Documentos enviados: | Descripcion-1.pdf (31 p.) Dibujos-1.pdf (1 p.) Reivindicaciones-1.pdf (5 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) FEERCPT-1.pdf (1 p.) SEQLPDF.pdf (11 p.) SEQLTXT.txt | package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf |
| Enviados por: | CN=ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84921709 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es | |
| Fecha y hora de recepción: | 02 junio 2010, 13:59 (CEST) | |
| Codificación del envío: | 12:A1:07:B6:DC:3F:71:66:C3:A6:41:D3:F3:A8:95:38:F8:F7:A1:22 | |

/Madrid, Oficina Receptora/



| | | |
|-------------------------------------|---|---|
| (1) MODALIDAD: | PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD | <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| (2) TIPO DE SOLICITUD: | PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL | <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| (3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN: | MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD: | |
| (4) LUGAR DE PRESENTACION: LUGAR | | OEPM, Presentación Electrónica |
| (5-1) SOLICITANTE 1: | DENOMINACION SOCIAL: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCION DEL DERECHO: INVENCION LABORAL: CONTRATO: SUCESION: | CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) España ES Q2818002D C/ SERRANO, 117 MADRID 28 Madrid 28006 España ES <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| (6-1) INVENTOR 1: | APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE: | PEREZ SANCHEZ RICARDO España ES 0-T. |
| (6-2) INVENTOR 2: | APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE: | OLEAGA PEREZ ANA España ES 0-T. |
| (6-3) INVENTOR 3: | APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE: | SILES LUCAS MAR España ES 0-T. |

| | |
|---|---|
| <p>(6-4) INVENTOR 4:</p> <p style="text-align: right;">APELLIDOS: DIAZ MARTIN NOMBRE: VERONICA NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/PASAPORTE: 0-T.</p> <p>(6-5) INVENTOR 5:</p> <p style="text-align: right;">APELLIDOS: MANZANO ROMAN NOMBRE: RAUL NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/PASAPORTE: 0-T.</p> | |
| (7) TÍTULO DE LA INVENCION: | ANTIGENO RECOMBINANTE DE LA GARRAPATA ORNITHODOROS MOUBATA |
| (8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA: | <p style="text-align: right;">SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/></p> |
| (9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN | <p style="text-align: right;">SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/></p> |
| (10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERÍA BIOLÓGICA: | <p style="text-align: right;">SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/></p> |
| (11) DEPÓSITO: | |
| (12) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS: | |
| (13) EXPOSICIONES OFICIALES: | |
| (14) DECLARACIONES DE PRIORIDAD: | |
| (15) AGENTE/REPRESENTANTE: | <p style="text-align: right;">APELLIDOS: PONS ARIÑO NOMBRE: ANGEL NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/CIF/PASAPORTE: 50534279-J</p> <p style="text-align: right;">DOMICILIO: GLORIETA DE RUBÉN DARIO, 4 LOCALIDAD: MADRID PROVINCIA: 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 28010 PAÍS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAÍS: ES TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO:</p> |

| | |
|---|--|
| NÚMERO DE PODER: | 20081765 |
| (16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN: | <p>DESCRIPCIÓN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 31</p> <p>REIVINDICACIONES: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 35</p> <p>DIBUJOS: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 2</p> <p>RESUMEN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1</p> <p>FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: <input type="checkbox"/> N.º de figura(s):</p> <p>ARCHIVO DE PRECONVERSION: <input type="checkbox"/></p> <p>DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p> <p>JUSTIFICANTE DE PAGO (1): <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1</p> <p>LISTA DE SECUENCIAS PDF: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 11</p> <p>ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>OTROS (Aparecerán detallados):</p> |
| (17) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES. DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA: | <p><input type="checkbox"/></p> <p>DOC COPIA DNI: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p> <p>DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p> <p>DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p> <p>DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p> <p>DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p> <p>DOC COPIA OTROS: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p> |
| (18) NOTAS: | |
| (19) FIRMA DIGITAL: | <p>FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE: ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84921709 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J</p> <p>LUGAR DE FIRMA: Madrid</p> <p>FECHA DE FIRMA: 02 Junio 2010</p> |



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

TASA en materia de Propiedad Industrial
CÓDIGO 511

Modelo
791

Identificación

Ejercicio: 2010

Nro. Justificante: 7915111570134

Sujeto Pasivo:

N.I.F.: Apellidos y Nombre o Razón social:

Calle/Plaza/Avda.: Nombre de la vía pública: N° Esc Piso Puerta Tfno.

Municipio: Provincia: Código Postal:

Agente o Representante legal: (1)

N.I.F.: Apellidos y Nombre o Razón social:

B84921709 PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL

Calle/Plaza/Avda.: Nombre de la vía pública: N° Esc Piso Puerta Tfno.

Municipio: Provincia: Código Postal:

Código de Agente o Representante: (2)

0000

Dígito de control:

0

Autoliquidación

Titular del expediente si es distinto del pagador:

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Expediente Modalidad: **P** Número: Tipo: (3)

Clave: **IE01** Año: **2010** Concepto: **Solicitud de Invención por Internet**

Unidades: **1** Importe: **68,0**

Referencia OEPM: **88024793027**



909992100200188024793027

Declarante

Fecha: **02/06/2010**

Firma:

**PONS PATENTES
Y MARCAS
INTERNACIONAL
SL**

Ingreso

Importe en Euros:

Adeudo en cuenta:



Entidad: **2100** Oficina: D.C. Nro. Cuenta

NRC Asignado: 7915111570134E7A3DF477

- (1) Solo cuando el pago se realice con cargo a la cuenta corriente del representante o agente.
- (2) En el caso de que tenga asignado un número por la OEPM.
- (3) En el caso de patentes europeas, se pondrá una P si es el número de publicación o una S si es el número de solicitud.
- (4) Una copia de este impreso se acompañará con la presentación de documentación en la OEPM.



| OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS | | |
|--|----------------------------------|----------------|
| Hoja informativa sobre pago de tasas de una solicitud de patente o modelo de utilidad | | |
| 1. REFERENCIA DE SOLICITUD | ES1641.758 | |
| 2. TASAS | Importe (en euros) | |
| Concepto | Código de barras asignado | Importe |
| Solicitud de demanda de depósito o de rehabilitación. | 88024793027 | 68,00 |
| Solicitud de cambio de modalidad en la protección | | 0,00 |
| Prioridad extranjera (0) | | 0,00 |
| Petición IET | | 0,00 |
| El solicitante se acoge a la exención del pago de tasas | <input type="checkbox"/> | |
| El solicitante es una Universidad pública | <input type="checkbox"/> | |
| | Importe total | 68,00 |
| | Importe abonado | 68,00 |
| | Importe pendiente de pago | 0,00 |

Se ha aplicado el 15% de descuento sobre la tasa de solicitud de acuerdo con la D. Adic. 8.2 Ley de Marcas.

Si no hubiera realizado el pago previamente al envío de la solicitud, consignando los números del código de barras en la casilla correspondiente, recibirá una notificación de la Oficina Española de Patentes y Marcas a partir de la recepción de la cual tendrá un mes para realizar dicho pago.

Transcurrido este plazo, sin que se hubiera procedido al pago de la tasa de solicitud, la solicitud de patente de invención o de modelo de utilidad se tendrá por desistida.

Antígeno recombinante de la garrapata *Ornithodoros moubata*.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biomedicina, en concreto, la presente invención se refiere a unas secuencias aminoacídicas
5 útiles para la detección de *Ornithodoros moubata*, al método de detección de *O. moubata* en muestras biológicas utilizando como proteína de detección las secuencias aminoacídicas de la presente invención, a un kit para llevar a cabo dicho método y, finalmente, a un kit para la producción de las secuencias aminoacídicas de forma recombinante.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las garrapatas son artrópodos hematófagos de importancia médica y veterinaria no sólo por los daños directos que provocan al hospedador
15 (reacciones alérgicas, parálisis, destrucción de tejidos, etc.) sino también porque son vectores de microorganismos patógenos para animales y humanos.

Ornithodoros moubata es una garrapata perteneciente a la familia de los argásidos, que se distribuye por el sur, este y centro del continente africano y la
20 isla de Madagascar colonizando hábitats silvestres y domésticos. En la naturaleza sus principales hospedadores son los facoceros, mientras que en el medio doméstico y peridoméstico sus principales hospedadores son los cerdos y los humanos (Hoogstral, 1956. *Department of Medical Zoology, U.S. Navel Medical Research Unit No. 3. Cairo, Egypt*; Roger et al., 2001. *Exp. Appl. Acarol.* (25) 263-269).
25

Este ectoparásito transmite, entre otros patógenos, *Borrelia duttoni*, una espiroqueta que produce la Fiebre recurrente humana endémica de África oriental. Esta enfermedad afecta sobre todo a niños y mujeres embarazadas y
30 produce altas tasas de mortalidad perinatal (Cutler, 2006. *Emer. Infec. Dis.* (12) 369-374). *O. moubata* también transmite el virus de la Peste porcina africana, una enfermedad altamente contagiosa en cerdos domésticos con un amplio

rango de presentaciones clínicas que van desde la forma hiperaguda letal hasta la crónica y la inaparente (Basto et al., 2006. *J. Gen. Virol.* (87) 1863-1871), así como varios virus productores de encefalitis, pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, como el virus del Nilo Occidental (West Nile) (Lawrie et al.,
5 2004. *Emerg Infect Dis.* 10 (4) 653-657) y los virus *Karshi* y *Langat* (Turrel et al., 2004 . *J Med Entomol.* 41 (5) 973-977).

Para facilitar la prevención y control de las enfermedades que transmite, sería necesario eliminar *O. moubata* de, al menos, el medio doméstico y
10 peridoméstico (viviendas humanas, dependencias animales, etc.).

La erradicación de esta garrapata de dicho medio requiere el conocimiento detallado de los lugares en los que se encuentra para aplicar en ellos las oportunas medidas de control anti-garrapata (por ejemplo, acaricidas). Para
15 ello, el primer paso es detectar las zonas donde se encuentra la garrapata, para poder posteriormente, aplicar en ellos los correspondientes controles.

Teniendo en cuenta que la detección de las zonas donde se encuentra la garrapata no sería viable mediante la búsqueda directa del parásito en el
20 terreno, pues es un proceso laborioso que exige de una inspección minuciosa de todos los agujeros y grietas que puedan servir de refugio a la garrapata en cada granja, o zona en estudio, antes de poder declarar dicha granja libre del parásito, es necesario la búsqueda de otros procedimientos alternativos que den lugar a estudios epidemiológicos a media o gran escala.

25 Una alternativa a la búsqueda directa de la garrapata es el desarrollo de métodos serológicos de detección de las granjas infestadas con *O. moubata*. Estos métodos estarían basados en la detección de anticuerpos específicos frente a la garrapata en muestras de suero tomadas a los animales de las
30 granjas del área de estudio.

Es conocido que la saliva de las garrapatas contiene diversas moléculas capaces de modificar la fisiología de sus hospedadores, por lo que debido al importante papel biológico que juega este fluido, se han desarrollado distintos métodos serológicos destinados a detectar *O. moubata* utilizando como
5 antígeno SGE, un extracto de proteínas de las glándulas salivares de esta garrapata (Baranda et al., 2000. *Vet. Parasitol.* (87) 193-206)

A pesar de que las pruebas desarrolladas en animales infestados experimentalmente en laboratorio indican que el SGE de *O. moubata* puede
10 utilizarse con bastante fiabilidad como antígeno diagnóstico, la utilización de este extracto de proteínas para la detección de *O. moubata* presenta varios inconvenientes entre los que se destacan:

- la obtención de SGE, proceso laborioso y poco eficiente en cuanto al
15 rendimiento de la proteína, lo que dificulta su uso para estudios epidemiológicos a gran escala;
- es un extracto de composición compleja y poco conocida, lo cual impide su estandarización y universalización;
- proporciona una elevada reactividad basal, la cual dificulta la detección
20 de sueros positivos con baja reactividad y,
- puede contener componentes antigénicos no específicos que den lugar a falsos positivos.

Por ello, es necesario desarrollar nuevos procedimientos de detección de *O.*
25 *moubata* que den lugar a un método de diagnóstico mucho más específico y efectivo que los métodos de diagnóstico conocidos hasta el momento que utilizaban SGE como proteína de detección.

La detección de *O. moubata* es crucial para facilitar la prevención y control de
30 las enfermedades que transmite, pero la erradicación de esta garrapata del medio doméstico y peridoméstico donde se encuentra, requiere desarrollar métodos alternativos a la detección directa de la garrapata en el medio y,

aunque los métodos serológicos permitirían identificar este ectoparásito, aún no se ha encontrado una proteína de detección que de lugar a un método efectivo, sensible y específico de la garrapata.

5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona unas secuencias aminoacídicas útiles para la detección de anticuerpos específicos frente a *O. moubata* en muestras biológicas, un método de detección de dichos anticuerpos en muestras biológicas utilizando como proteína de detección las secuencias aminoacídicas de la presente invención, un kit para llevar a cabo dicho método y, finalmente, un kit para la producción de las secuencias aminoacídicas de forma recombinante.

En la presente invención se describen unas secuencias aminoacídicas capaces de identificar de manera específica y efectiva *O. moubata* en medios domésticos y peridomésticos.

Es de destacar que las secuencias aminoacídicas propuestas en la presente invención, pertenecen a proteínas salivales del argásido *O. moubata* que, al contrario con lo que ocurría con SGE, poseen secuencias aminoacídicas, preferiblemente SEQ ID NO: 1, que los inventores han descubierto sorprendentemente, con sensibilidad y especificidad probadas, que dan lugar a la obtención de proteínas para la detección de anticuerpos específicos frente a *O. moubata* de manera sencilla y eficiente y, además, al no contener componentes antigénicos no específicos, no existen problemas de falsos positivos.

Por tanto, la presente invención resuelve el problema técnico que plantea la detección de *O. moubata* para poder combatir las enfermedades que transmite mediante un método serológico simple que emplea una proteína que sirve como antígeno de detección y que permite identificar de manera específica,

sensible y eficaz la existencia de anticuerpos específicos frente a la garrapata *O. moubata* en muestras de suero provenientes de mamíferos encontrados en medios domésticos y peridomésticos donde pueden habitar dichos hospedadores.

5

El uso de estas secuencias aminoacídicas permite entre otras aplicaciones:

- la obtención de las proteínas de forma sencilla y eficiente de manera que puedan ser estandarizadas para su uso en estudios epidemiológicos a gran escala,
- la detección de muestras biológicas infestadas con una elevada sensibilidad y,
- una elevada especificidad frente a anticuerpos de *O. moubata* debido a que las proteínas, que ha sido obtenidas de una lipocalina de la saliva de esta garrapata, no presentan componentes antigénicos no específicos que den lugar a falsos positivos.

10

15

Como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 1), no se conoce en el estado de la técnica ninguna proteína con un porcentaje de identidad mayor del 65 % con respecto a SEQ ID NO: 1.

20

| Proteína | SEQ ID NO | Nº Acceso | % de Identidad |
|--|------------------|------------------|-----------------------|
| lipocalin [Ornithodoros savignyi] | 13 | AAN76828.1 | 65 |
| moubatin 1-like 2 [Ornithodoros parkeri] | 14 | ABR23399.1 | 42 |
| moubatin-like 3 [Ornithodoros parkeri] | 15 | ABR23414.1 | 42 |
| salivary secreted lipocalin [Ornithodoros parkeri] | 16 | ABR23443.1 | 41 |

| | | | |
|--|----|------------|----|
| moubatin-like 1 [Ornithodoros parkeri] | 17 | ABR23347.1 | 34 |
| salivary lipocalin [Ornithodoros parkeri] | 18 | ABR23445.1 | 42 |
| moubatin-like 5 variant [Ornithodoros parkeri] | 19 | ABR23458.1 | 36 |
| moubatin-like 5 [Ornithodoros parkeri] | 20 | ABR23457.1 | 37 |
| short salivary moubatin [Ornithodoros parkeri] | 21 | ABR23415.1 | 38 |

Tabla 1. Porcentajes de identidad de distintas proteínas con la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1. Muestra las proteínas cuyas secuencias aminoacídicas presentan un porcentaje de identidad mayor con la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

En este sentido, un primer aspecto de la presente invención se refiere a la secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 66% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1. Preferiblemente la secuencia nucleotídica codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 85% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente la secuencia nucleotídica codifica para una secuencia aminoacídica donde dicha secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 1.

El término "% de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos, tal como se entiende en la presente invención, se refiere al número de posiciones aminoacídicas sobre la longitud total de la secuencia que se compara, donde todos los aminoácidos en esa posición son idénticos.

Más preferiblemente, la presente invención se refiere a la secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 66,

68, 70, 73, 75, 77, 80, 83, 85, 87, 90, 93, 95, 97, 98, 99, 100% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.

5 La expresión “secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 66% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1” tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia a una secuencia de ADN en la que una parte de dicha secuencia codifica para una proteína con al menos un 66% de identidad con SEQ ID NO: 1. Esto significa que cuando dicha secuencia nucleotídica sea transcrita y traducida, se
10 generará una secuencia aminoacídica que comprenderá o tendrá al menos un 66% de identidad con SEQ ID NO: 1. Esta descripción es extrapolable a las secuencias nucleotídicas que codifican para las secuencias aminoacídicas con los porcentajes de identidad que se han mencionado en párrafos anteriores con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.

15 La expresión “secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica donde dicha secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 1” tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia a una secuencia de ADN en la que una parte de dicha secuencia codifica para la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1. Es decir, cuando dicha secuencia nucleotídica sea
20 transcrita y traducida, se generará una secuencia aminoacídica que comprenderá o será SEQ ID NO: 1. El término “proteína”, por su parte, hace referencia a cualquier secuencia aminoacídica aislada o recombinante que comprende dos o mas aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres peptídicos.
25

El término “codifica” tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia a la correlación que existe entre los tripletes de nucleótidos o codones y los aminoácidos que forman los péptidos, las secuencias aminoacídicas o las
30 proteínas. Cuando se dice que una secuencia nucleotídica codifica para una proteína, significa que cuando dicha secuencia nucleotídica sea transcrita y traducida, se generará dicha proteína.

En una realización preferida de la presente invención, la secuencia nucleotídica es SEQ ID NO: 2.

5 De aquí en adelante, para hacer referencia a cualquiera de las secuencias nucleotídicas descritas en párrafos anteriores, es decir, aquellas secuencias nucleotídicas que codifiquen para una secuencia aminoacídica con un porcentaje de identidad comprendido entre los que se han mencionado en párrafos precedentes con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1, se puede emplear el término “secuencias nucleotídicas de la invención”.

10

Otro aspecto de la presente invención se refiere al vector de expresión, en adelante vector de la invención, que comprende cualquiera de las secuencias nucleotídicas de la invención.

15 El vector de la invención puede ser por ejemplo, pero sin limitarse, un vector o un plásmido biológicamente funcional. Preferentemente el vector de la invención es un vector de expresión génica que permite la regulación de las secuencias nucleotídicas de la invención que incorpora, en condiciones adecuadas, en el interior de las células. Más preferentemente, el vector de
20 expresión permitirá la expresión de la secuencia aminoacídica que codifica para cualquiera de las secuencias nucleotídicas de la invención.

Las secuencias nucleotídicas de la invención pueden estar contenidas en una construcción génica. Además, la construcción génica también puede contener,
25 en caso necesario, y para permitir un mejor aislamiento de la proteína expresada, una secuencia nucleotídica que codifique para un péptido capaz de ser utilizado con fines de aislamiento, detección o secreción de dicha proteína, por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, una secuencia de hexahistidina (Genzt et al. 1989. *PNAS* (86) 821-824), o de
30 glutatión-S-transferasa o cualquier otra secuencia que sirva para purificar la proteína expresada por cromatografía de afinidad (péptidos etiqueta tales como c-myc, HA o E-tag (Using antibodies: a laboratory manual. *Ed. Harlow and Lane*

(1999). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Capítulo: *Tagging proteins*. pp. 347-377)).

5 La construcción genética aquí descrita puede obtenerse por un experto mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas (Sambrook et al., 1989. "Molecular cloning, a laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1-3)).

10 Además de las secuencias nucleotídicas de la invención o de la construcción génica que las contiene, el vector de la invención puede contener un promotor que dirige su transcripción y al que está operativamente enlazado (por ejemplo, pT7, plac, ptrc, pBad, ret, etc.), así como otras secuencias necesarias o apropiadas que controlan y regulan dicha transcripción y, en su caso, la traducción del producto de interés; por ejemplo, señales de inicio y terminación
15 (tlt2, etc.), señal de poliadenilación, origen de replicación, secuencias de unión a ribosomas, secuencias codificantes de reguladores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), represores, etc. Sin que sirva de limitación, ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso
20 concreto entre plásmidos de expresión, vectores virales, cósmidos, cromosomas artificiales, etc. que pueden contener, además, marcadores utilizables para seleccionar las células transfectadas o transformadas con el gen o genes de interés.

25 La elección del vector dependerá de la célula hospedadora y del tipo de uso que se quiera realizar. Preferentemente el vector de la presente invención es un plásmido. La obtención de dicho vector puede realizarse por cualquier método convencional conocido por un experto en la materia. Igualmente, para la transformación de células eucariotas o procariotas se puede utilizar cualquier
30 método de transferencia de material génico descrito en diversos manuales (Sambrook et al. 1989. "Molecular cloning, a laboratory Manual" 2nd ed. Cold

Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1-3)) como por ejemplo pero sin limitarse, transformación química, electroporación, microinyección, etc.

5 Tal y como se utiliza en la presente descripción el término “transformación” se refiere a la introducción de, al menos, un vector de la invención en la célula hospedadora.

El vector empleado para clonar la secuencia nucleotídica de la invención SEQ ID NO: 2 fue el plásmido pQE-30 (ver ejemplo 1 de la invención).

10

Otro aspecto de la presente invención se refiere al producto de expresión de cualquiera de las secuencias nucleotídicas de la presente invención. En una realización preferida, el producto de expresión es una secuencia aminoacídica con al menos un 66 % de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.

15

En una realización más preferida, el producto de expresión es una secuencia aminoacídica con al menos un 85 % de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1. Y, en una realización aún más preferida el producto de expresión es una secuencia aminoacídica de secuencia SEQ ID NO: 1.

20

Más preferiblemente, el producto de expresión es una secuencia aminoacídica con al menos un 66, 68, 70, 73, 75, 77, 80, 83, 85, 87, 90, 93, 95, 97, 98, 99, 100% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1

25 El término “producto de expresión”, tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia al producto resultante de la transcripción (ARN) o de la traducción (proteína) de cualquiera de las secuencias nucleotídicas de la presente invención, o a cualquier forma resultante del procesamiento del producto resultante de la transcripción o de la expresión de cualquiera de las secuencias nucleotídicas de la presente invención.

30

De aquí en adelante, para hacer referencia al producto de expresión según se describe en párrafos anteriores, se puede emplear el término “producto de

expresión de la invención”, “proteína de la invención” o “antígeno de la invención”.

5 El producto de expresión de la invención puede ser, pero sin limitarse, la proteína OmTSGP1 descrita en los ejemplos de la invención.

10 El término “antígeno de la invención” hace referencia a una molécula (generalmente una proteína o un polisacárido), que puede inducir la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmunitaria, en general, abarca a todas las sustancias que pueden ser reconocidas por el sistema inmune adaptativo, sean propias o ajenas, como por ejemplo pero sin limitarse, las proteínas o péptidos, los polisacáridos y, más raramente, otras moléculas como los lípidos y ácidos nucleicos. Cada antígeno está definido por su anticuerpo, los cuales interactúan por complementariedad espacial, la zona donde el antígeno se une al anticuerpo recibe el nombre de epítipo o determinante antigénico.

20 El producto de expresión de la invención puede ser, pero sin limitarse, una proteína recombinante (como por ejemplo, la proteína recombinante OmTSGP1 en los ejemplos de la invención), es decir, una proteína no presente en un organismo determinado y producida a partir de ADN recombinante o ADN artificial formado de manera deliberada *in vitro* por la unión de secuencias de ADN proveniente de dos organismos de especies diferentes que normalmente, no se encuentran juntos.

25

Otro aspecto de la presente invención se refiere al anticuerpo aislado, en adelante anticuerpo de la invención, capaz de reconocer el producto de expresión de la invención. El término “anticuerpo” tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con el producto de expresión de la

30

invención. Hay cinco isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE).

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a la célula transformada que comprende cualquiera de las secuencias nucleotídicas de la presente invención o el vector de expresión de la presente invención o el producto de expresión de la presente invención. La célula hospedadora también puede contener la construcción genética que contiene las secuencias nucleotídicas de la presente
10 invención. Las células hospedadoras de la presente invención son células hospedadoras transformadas establemente con el vector de la invención, las secuencias nucleotídicas de la presente invención, la construcción genética que contiene estas secuencias nucleotídicas o el producto de expresión de la presente invención. Preferentemente la célula hospedadora pertenece a un
15 microorganismo y más preferentemente pertenece a un microorganismo procarionta. Aunque en los ejemplos de la presente invención se ha usado la bacteria *E. coli*, cepa M15, como hospedadora, estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones de la invención que aquí se reivindica.

20

Así, en el ejemplo 1 del presente documento se expresa el producto de expresión de la invención, la proteína OmTSGP1 recombinante, a partir de una célula de la cepa M15 de *E. coli*.

25 El producto de expresión de la invención puede ser purificado mediante el empleo de técnicas conocidas por un experto en la materia. En el ejemplo 1 de la presente invención se muestra como el producto de expresión es purificado mediante su inmovilización en una matriz cromatográfica, la resina His-Bind cargada con níquel (Novagen), y su posterior disociación mediante lavado de
30 dicha matriz con un medio conteniendo imidazol como ligando competidor. En este punto, la invención proporciona una proteína pura y en cantidades suficientes para permitir el desarrollo de composiciones farmacéuticas.

Así, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, en adelante primera composición de la invención, que comprende el vector de expresión de la invención, el producto de expresión de la invención o la célula transformada de la invención. Y en otro aspecto, la
5 invención se refiere a una composición farmacéutica, en adelante segunda composición de la invención, que comprende el anticuerpo de la invención. En una realización preferida la primera y segunda composición de la invención además comprenden, al menos, un excipiente y/o al menos, un vehículo farmacológicamente aceptable.

10

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción del producto de expresión de la invención, la célula transformada de la invención o el anticuerpo de la invención, estabiliza dichos compuestos o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle
15 consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o
20 cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

25

Un “vehículo farmacológicamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los compuestos de la
30 presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación del producto de expresión de la invención así como también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la

composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. El término “farmacológicamente aceptable” se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

5

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de cualquiera de las secuencias nucleotídicas de la invención, del vector de expresión de la invención, del producto de expresión de la invención y/o del anticuerpo de la invención para la detección y/o cuantificación de *O. moubata* en una muestra biológica aislada.

10

El término “muestra biológica aislada”, tal y como se utiliza en la descripción se refiere, pero no se limita, a tejidos y/o fluidos biológicos de un sujeto, preferentemente suero o plasma sanguíneo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. El término “sujeto”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a mamíferos, preferiblemente humanos o animales, y más preferiblemente, artiodáctilos de la familia *Suidae* como por ejemplo, pero sin limitarse, cerdos domésticos, jabalíes, o facoceros.

15

20

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de cualquiera de las secuencias de la invención, del vector de expresión de la invención, del producto de expresión de la invención, del anticuerpo de la invención o de la célula de la invención para la fabricación de un medicamento. En una realización preferida de la presente invención, dicho medicamento se utiliza para la prevención y control de una enfermedad transmitida por *O. moubata*. Estas enfermedades pueden ser, pero sin limitarse, la Fiebre recurrente humana endémica de África oriental, enfermedad que afecta principalmente a niños y mujeres embarazadas y que produce altas tasas de mortalidad perinatal, la Peste porcina africana, enfermedad altamente contagiosa en cerdos domésticos con un amplio rango de presentaciones clínicas que van desde la forma hiperaguda letal hasta la crónica y la inaparente o las encefalitis virales, producidas por los virus de la familia *Flaviviridae* entre los que se

25
30

encuentran, pero sin limitarse, los virus *del Nilo Occidental (West Nile)* (Lawrie et al., 2004. *Emerg Infect Dis.* 10 (4) 653-657), *Karshi y Langat* (Turrel et al., 2004 . *J Med Entomol.* 41 (5) 973-977).

5 El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere, a las secuencias de la invención, el vector de expresión de la invención, el producto de expresión de la invención, el
10 anticuerpo de la invención o la célula de la invención, que es capaz de generar una respuesta inmune frente a un organismo dado, que está causando dicha enfermedad en el hombre o los animales. Preferentemente el medicamento es una vacuna.

15 En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" se refiere a una preparación antigénica empleada para establecer la respuesta del sistema inmune a una enfermedad. Son preparados de antígenos que una vez dentro del organismo provocan la respuesta del sistema inmunitario, mediante la producción de anticuerpos, y generan memoria inmunológica produciendo
20 inmunidad permanente o transitoria.

La vacuna, puede comprender excipientes farmacológicamente aceptables como por ejemplo pero sin limitarse, un adyuvante. Además, la vacuna presenta un origen recombinante.

25

En esta memoria, el término "adyuvante" se refiere a un agente, mientras no posea un efecto antigénico por si mismo, que puede estimular el sistema inmune incrementando su respuesta a la vacuna. Aunque sin limitarse, las sales de aluminio "fosfato de aluminio" e "hidróxido de aluminio" son los dos
30 adyuvantes más comúnmente empleados en las vacunas. Otras sustancias, como por ejemplo el escualeno, también se pueden emplear como adyuvantes.

Preferentemente el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral, cutánea, oral, epidural, sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada.

- 5 La forma adaptada hace referencia al modo de adecuar el medicamento de la presente invención para que pueda ser administrado por ejemplo pero sin limitarse, por vía parenteral, oral, rectal o transdérmica. La administración parenteral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración inyectable, es decir, preferiblemente en estado líquido. La administración
- 10 parenteral se puede llevar a cabo por vía de administración intramuscular, intraarterial, intravenosa, intradérmica, subcutánea o intraósea pero sin limitarse únicamente a estos tipos de vías de administración parenteral. La forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión
- 15 extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado. La forma adaptada a la administración rectal se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, supositorio, cápsula rectal, dispersión rectal o pomada rectal. La forma adaptada a la administración transdérmica se selecciona de la lista que comprende, pero sin
- 20 limitarse, parche transdérmico o iontoforesis.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al método, en adelante primer método de la invención, para la detección y/o cuantificación de *O. moubata* en un sujeto que comprende:

25

- a. detectar y/o cuantificar los anticuerpos de la invención en una muestra biológica aislada del sujeto.

- Preferentemente la muestra biológica pertenece a un mamífero y más
- 30 preferentemente el mamífero es un humano o un animal. Preferiblemente el animal es un artiodáctilo de la familia Suidae como por ejemplo, pero sin limitarse, cerdo doméstico, jabalí, o facocero. En una realización más preferida,

la muestra biológica es suero ó plasma sanguíneo obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para llevar a cabo el primer método de la invención.

- 5 La expresión “detectar y/o cuantificar” anticuerpos en la muestra obtenida, tal y como se emplea en la descripción del método de la invención, hace referencia a la detección de la presencia y/o a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semicuantitativa o cuantitativa.
- 10 De acuerdo con la presente invención, la detección y/o cuantificación de anticuerpos de la invención frente a las secuencias aminoacídicas que comprenden el producto de expresión de la invención puede ser llevada a cabo por cualquier método conocido en el estado de la técnica. En una realización preferida de la presente invención la detección y/o cuantificación de los
- 15 anticuerpos se lleva a cabo mediante inmunoensayo. En una realización más preferida, en el inmunoensayo se emplea la secuencia aminoacídica que comprende el producto de expresión de la invención.

El término “inmunoensayo”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se

20 refiere a cualquier técnica analítica, basada en la reacción de conjugación de la secuencia aminoacídica que comprende el producto de expresión de la invención, de sus variantes o de un fragmento de las mismas con un anticuerpo que las reconoce.

25 Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: inmunoblot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, inmunohistoquímica o microarrays de proteínas.

30 Preferentemente la detección y/o cuantificación de los anticuerpos del método de la invención se lleva a cabo mediante inmunoensayo que puede ser un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (Enzyme-Linked

ImmunoSorbent Assay). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno de la muestra biológica o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador. Existen diferentes tipos de ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA sándwich.

El ELISA puede ser un ELISA indirecto, que puede comprender los siguientes pasos: (a) recubrir un soporte sólido con un lisado de células con el producto de expresión de la invención (b) incubar el soporte recubierto del paso (a) con una muestra biológica aislada obtenida del sujeto en condiciones que permitan la formación de un inmunocomplejo del anticuerpo frente al producto de expresión de la invención presente en la muestra, con los antígenos que comprenden el producto de expresión de la invención; y (c) incubar con un anticuerpo secundario, que reconoce al anticuerpo frente a la secuencia aminoacídica que comprende el producto de expresión de la invención, conjugado o unido a un compuesto marcador.

El término “compuesto marcador”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y/o cuantificación de la cantidad del anticuerpo frente a la secuencia aminoacídica que comprende el producto de expresión de la invención. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ^{33}P o ^{35}S , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa por colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía, respectivamente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al método, en adelante segundo método de la invención, para el diagnóstico de una enfermedad producida y/o transmitida por *O. moubata* en un sujeto que comprende, además del paso (a) del primer método de la invención:

5

- b. comparar los datos obtenidos en (a) con unos valores de referencia para encontrar una desviación significativa.
- c. atribuir la desviación significativa a la presencia de la enfermedad producida y/o transmitida por *O. moubata* en dicho sujeto.

10

Como se ha comentado anteriormente, entre las enfermedades transmitidas por *O. moubata* se encuentran, pero sin limitarse, la Fiebre recurrente humana endémica de África oriental, la Peste porcina africana y las encefalitis virales producidas por virus de la familia *Flaviviridae*, entre los que se encuentran, pero sin limitarse, los virus *del Nilo Occidental (West Nile)*, *Karshi* y *Langat*.

15

Otro aspecto de la invención se refiere al kit, en adelante primer kit de la invención, que comprende el producto de expresión de la invención. Y, una realización preferida se refiere al primer kit de la invención que además comprende un soporte sólido donde está fijado el producto de expresión de la invención. En otra realización preferida la invención se refiere al uso del primer kit de la invención para la detección y/o cuantificación de *O. moubata* en una muestra biológica asilada.

20

Son conocidos en el estado de la técnica diferentes soportes sólidos que pueden ser empleados para la realización del primer kit de la invención.

25

Este kit puede comprender además del soporte sólido y el producto de expresión de la invención, todos los componentes necesarios para llevar a cabo la detección y/o cuantificación de *O. moubata* en una muestra biológica asilada según se describe en el primer método de la invención.

30

En una realización más preferida, la muestra biológica pertenece a un mamífero y aún más preferentemente el mamífero es un humano o un animal. Preferiblemente el animal es un artiodáctilo de la familia Suidae como por ejemplo, pero sin limitarse, cerdo doméstico, jabalí, o facocero. En otra
5 realización más preferida, la muestra biológica es suero ó plasma sanguíneo obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para llevar a cabo el primer kit de la invención.

Y, finalmente otro aspecto de la invención se refiere al kit, en adelante segundo
10 kit de la invención, que comprende cualquiera de las secuencias nucleotídicas de la invención o el vector de expresión de la invención. Preferentemente este kit es utilizado para la producción del producto de expresión de la invención de forma recombinante en una célula que comprende dicho kit, como se muestra en el ejemplo 1 del presente documento.

15 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y
20 en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 **Fig. 1. Muestra la expresión de la proteína recombinante OmTSGP1 como proteína de fusión con etiqueta de hexahistidina en el vector pQE-30.**

Se muestra un SDS-PAGE mostrando el sobrenadante (SB) y el sedimento
30 (SD) del extracto celular, antes de la inducción de la expresión con IPTG (No ind.) y a las 3 horas de la inducción. La proteína recombinante OmTSGP1 se expresa en forma insoluble y es solubilizada casi completamente con urea 8M

como indica su presencia en el extracto SB.U (sedimento después de añadir urea 8M).

MW, peso molecular.

5 **Fig. 2. Muestra la purificación de la proteína recombinante OmTSGP1 a partir del extracto SB.U por cromatografía de afinidad en resina de níquel.**

Res., proteínas del extracto SB.U fijadas a la resina.

10 Elu., proteína recombinante OmTSGP1 pura tras su elución la resina con imidazol 1M.

EJEMPLOS

15 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del método de detección diseñado para *O. moubata* en muestras biológicas que comprende el producto de expresión de la invención, la proteína OmTSGP1.

20 A lo largo de los ejemplos se muestra un método para obtener la proteína OmTSGP1 de manera recombinante y la utilización de esta proteína obtenida como antígeno para la detección de anticuerpos frente a *O. moubata* en muestras biológicas aisladas de suero de cerdo. Cuando se compararon los resultados obtenidos con la proteína OmTSGP1 con los que se obtenían con el extracto peptídico SGE, se vio que la proteína OmTSGP1 mostró una eficiencia diagnóstica superior a la que obtuvo cuando se utilizó como antígeno
25 diagnóstico SGE. Estos resultados, junto con las ventajas que aporta el uso de una secuencia conocida sin otros componentes antigénicos que dificulten la detección de *O. moubata* convierten a la proteína OmTSGP1 en un candidato adecuado para su uso en un método para la detección de la garrapata.

30

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos

ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones de la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

5

EJEMPLO 1. Obtención de la proteína OmTSGP1.

1.1. Purificación de ARN total de glándulas salivales de *Ornithodoros moubata*.

10

Se diseccionaron 10 hembras y 10 machos de *O. moubata* y se extrajeron sus glándulas salivales según la técnica descrita en Baranda et al. 1997. *J. Parasitol.* (83) 831-838. El ARN total de dichas glándulas se purificó utilizando el kit *NucleoSpin RNA II* (Macherey-Nagel) de acuerdo con los protocolos suministrados por el fabricante.

15

1.2. Obtención de la secuencia nucleotídica codificante (ADN complementario) de la proteína OmTSGP1.

20 Se obtuvo en tres pasos consecutivos, mediante las técnicas 3' RACE, 5' RACE y RT-PCR, que se detallan a continuación.

Se partió de la secuencia de aminoácidos de un fragmento interno de la proteína OmTSGP1 de la garrapata *O. moubata*, el fragmento EHSCVYILPP (SEQ ID NO: 3) (descrito en Oleaga et al., 2007. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (37) 1149-1159). A partir de esta secuencia se diseñó un oligonucleótido específico que permitió la amplificación del extremo 3' de la secuencia codificante de la proteína OmTSGP1 por la técnica 3' RACE. Este cebador fue:

25
30

Cebador no.1: GAGCACAGCTGCGTGTACATCCTGCCCCC (SEQ ID NO: 4)

1.2.1. Amplificación y secuenciación del extremo 3' por 3' RACE.

Para ello se utilizó el kit *5'/3' RACE Kit, 2nd Generation* (Roche). En primer lugar se sintetizó el ADN complementario (ADNc) a partir del ARN salival de *O. moubata*, utilizando los reactivos y el protocolo suministrados en este kit. A
5 continuación se realizó una PCR sobre el ADNc anterior utilizando el cebador no.1 descrito en el apartado anterior (SEQ ID NO: 4) y el “cebador de anclaje” (anchor primer) (GACCACGCGTATCGATGTCGAC (SEQ ID NO: 5)) suministrado en el kit. La PCR se realizó en condiciones estándar, con BioTaq
10 (Bioline), sobre un termociclador Techne T-512, en 35 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 66°C y 40 segundos a 72°C, con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

El producto de PCR, de unos 500 pares de bases, se cargó en un gel de
15 agarosa con bromuro de etidio para ser purificado. Este producto de PCR se purificó con el kit *Strataprep DNA gel extraction kit* (Stratagene) siguiendo el protocolo del fabricante.

El producto purificado se clonó en el vector pSC-A utilizando los reactivos y
20 protocolos suministrados con el kit *StrataClone™ PCR Cloning Kit* (Stratagene). La ligación se usó para transformar células competentes *E. coli* SoloPack (suministradas con el kit) en una reacción estándar de transformación, y se sembró en placas de LB-agar con ampicilina y X-gal.

25 El análisis de transformantes (colonias blancas) mediante secuenciación del inserto en ambas cadenas con los cebadores T3 y T7 permitió obtener un fragmento de secuencia codificante (ADNc) de la proteína OmTSGP1 de 383 pares de bases que incluyó el extremo 3' hasta el codón de terminación (SEQ ID NO: 6).

1.2.2. Amplificación y secuenciación del extremo 5' por 5' RACE.

Sobre la secuencia anterior se diseñaron dos cebadores específicos, reversos, que permitieron amplificar el extremo 5' de la secuencia codificante de la proteína OmTSGP1 siguiendo los protocolos del kit *5'/3' RACE Kit, 2nd Generation* (Roche). Estos cebadores fueron:

Cebador no.2: 5' CTATGGTACCCACAGCTCAAGATATGG (SEQ ID NO: 7)

Cebador no.3: 5' GGTCATTGTCATTGATGTTGCTGCCC (SEQ ID NO: 8)

10

A partir del ARN salival se sintetizó la primera cadena de ADNc específica del OmTSGP1 mediante una reacción de transcripción reversa utilizando el cebador 2 y los reactivos del kit mencionado. La reacción se realizó en condiciones estándar durante 60 minutos a 55°C y 5 minutos a 85°C.

15

A continuación la cadena de ADNc recién sintetizada se purificó utilizando otro kit, por ejemplo, el *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche), y una vez purificada se sometió a una reacción de poliadenilación del extremo 3'. La reacción se realizó, según el protocolo del kit, durante 25 minutos a 37°C y 10 minutos a 72°C para inactivar la transferasa terminal.

20

Sobre el ADNc poliadenilado se realizó una PCR en nido. La primera PCR se realizó con el cebador no.2 (SEQ ID NO: 7) y el "cebador de anclaje-oligo dT" (oligo dT-anchor primer) suministrado con el kit:

25

GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV; (V= A, C o G).
(SEQ ID NO: 9)

Esta primera PCR se realizó en condiciones estándar, con BioTaq (Bioline), sobre un termociclador Techne T-512, en 35 ciclos. Los 10 primeros ciclos fueron de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 30°C y 40 segundos a 72°C. Los

30

25 ciclos siguientes fueron de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C y 40 segundos a 72°C, con una extensión final de 5 minutos a 72°C.

5 El producto de la PCR anterior se diluyó 1:20 y se reamplificó utilizando el cebador no.3 (SEQ ID NO: 8) y el “cebador de anclaje” (anchor primer) suministrado en el kit (SEQ ID NO: 5). Esta segunda PCR se realizó en 35 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 64°C y 40 segundos a 72°C, con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

10 El producto de PCR, de unas 380 pares de bases, se cargó en un gel de agarosa con bromuro de etidio y se purificó con el kit *Strataprep DNA gel extraction kit* (Stratagene).

15 El producto purificado se clonó en el vector pSC-A utilizando los reactivos y protocolos suministrados con el kit *StrataClone™ PCR Cloning Kit* (Stratagene). La ligación se usó para transformar células competentes *E. coli* SoloPack (suministradas con el kit) en una reacción estándar de transformación, y se sembró en placas de LB-agar con ampicilina y X-gal.

20 El análisis de transformantes (colonias blancas) mediante secuenciación del inserto en ambas cadenas con los cebadores T3 y T7 permitió obtener un fragmento de secuencia codificante (ADNc) de la proteína OmTSGP1 de 334 pares de bases que incluyó el extremo 5' desde el codón de inicio (SEQ ID NO: 10).

25

1.2.3. Amplificación y secuenciación de la secuencia codificante completa.

30 A partir de las secuencias de los extremos 5' (SEQ ID NO: 10) y 3' (SEQ ID NO: 6) se diseñaron dos cebadores específicos que permitieron amplificar la secuencia codificante completa de la proteína OmTSGP1 desde el codón de inicio hasta el de terminación. En estos cebadores se incluyeron adaptadores

para la enzima de restricción BamH1 con objeto de facilitar el subclonaje de la secuencia codificante en un vector de expresión. Los cebadores fueron los que figuran a continuación, en los que el sitio BamH1 aparece subrayado:

- 5 BamH1OmTSGP1Fwd GGATCCATGCACCGGCTGCTACTGCTACTC (SEQ ID NO: 11)
 BamH1OmTSGP1Rev GGATCCTCAACTTTTTTGCTCGATGACGTCAGC (SEQ ID NO: 12)

- 10 El ARN total extraído de las glándulas salivales en el punto 1.1. se sometió a transcripción reversa utilizando el kit *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* (Roche). Sobre el ADNc así obtenido se realizó una PCR utilizando los cebadores SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12. La PCR se realizó en condiciones estándar, con BioTaq (Bioline), en 35 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30
 15 segundos a 64°C y 40 segundos a 72°C, con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

El producto de PCR se cargó en un gel de agarosa con bromuro de etidio y se purificó con el kit *Strataprep DNA gel extraction kit* (Stratagene).

20

- El producto purificado se clonó en el vector pSC-A utilizando los reactivos y protocolos suministrados con el kit *StrataClone™ PCR Cloning Kit* (Stratagene). La ligación se usó para transformar células competentes *E. coli* SoloPack (suministradas con el kit) en una reacción estándar de
 25 transformación, y se sembró en placas de LB-agar con ampicilina y X-gal.

- El análisis de transformantes (colonias blancas) mediante secuenciación del inserto en ambas cadenas con los cebadores T3 y T7 permitió elegir los que estaban clonados correctamente y obtener la secuencia codificante completa
 30 de la proteína OmTSGP1 de 597 pares de bases. Esta secuencia es SEQ ID NO 2.

1.3. Subclonaje de la secuencia codificante completa de la proteína OmTSGP1 en el vector de expresión pQE-30 (Quiagen).

El polinucleótido recombinante en el vector pSC-A obtenido en el apartado anterior se digirió con la enzima BamH1 para extraer el inserto. En paralelo, el vector pQE-30 se digirió con la misma enzima y se defosforiló, todo ello en condiciones estándar. Ambos, inserto y vector, se cargaron en un gel de agarosa con bromuro de etidio y se purificaron a partir del gel como se ha descrito previamente. Tras la ligación inserto-vector, también en unas condiciones estándar, la ligación se usó para transformar células *E. coli* XL1, que una vez transformadas se sembraron en placas de LB-agar con ampicilina.

El análisis de transformantes permitió elegir los clones que estaban clonados correctamente. El clon elegido se utilizó para transformar células de expresión *E. coli* cepa M15 [pREP4] (Quiagen) mediante una reacción de transformación estándar descrita en el manual suministrado por el fabricante.

1.4. Expresión y purificación de la proteína OmTSGP1 en forma recombinante.

El clon fue incubado en medio LB con ampicilina y kanamicina a 37°C en agitación a 180 rpm. Se indujo la expresión proteica mediante IPTG 1 mM cuando la densidad óptica del cultivo a 600 nm fue de 0,6, y se dejó en incubación durante 3 horas más.

La proteína recombinante OmTSGP1 tiene 198 aminoácidos, 21,7 kDa (SEQ ID NO: 1).

Para purificar la proteína recombinante, que es expresada por el vector pQE-30 con una etiqueta de hexahistidina en el extremo aminoterminal, se utilizó el kit *His•Bind Purification Kit* (Novagen) basado en una cromatografía de afinidad al níquel.

Las células se sonicaron en el tampón de ligación (suministrado en el kit), se centrifugaron a 20.000 rpm 15 minutos a 4°C y tanto el sobrenadante como el sedimento se analizaron por SDS-PAGE. Dado que más del 90% de la proteína recombinante se expresó en forma insoluble, se solubilizó añadiendo un agente caotrópico, en este caso urea 8M al sedimento del extracto celular (Figura 1).

El extracto solubilizado se cargó en la columna de afinidad y, tras los correspondientes lavados, la proteína recombinante se eluyó con el tampón de elución, que contenía imidazol 1M como ligando competidor.

La pureza de la proteína se comprobó por electroforesis en geles de acrilamida (Figura 2), y la cantidad de proteína producida se midió en el Nanodrop.

EJEMPLO 2. Eficiencia diagnóstica de la proteína recombinante OmTSGP1, en comparación con el SGE.

La proteína recombinante OmTSGP1 y el SGE se compararon en diferentes métodos serodiagnósticos, entre ellos la técnica ELISA.

2.1. Utilización de sueros de cerdo infestados experimentalmente con *O. moubata* y otros ectoparásitos.

Se hizo un primer ensayo con 18 sueros de cerdos infestados en el laboratorio con *O. moubata* y con 8 sueros de cerdos infestados en el laboratorio con otros ectoparásitos: el argásido *Ornithodoros erraticus*, los ixódidos *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma lusitanicum*, *Rhipicephalus bursa* y *R. turanicus*, el ácaro *Sarcoptes scabiei*, el piojo porcino *Haematopinus suis* y el mosquito culícido *Anopheles atroparvus*. En este ensayo también se incluyeron 20 sueros de cerdos experimentales negativos, procedentes de granjas intensivas libres de ectoparásitos.

Se utilizó un protocolo estándar para la realización del ELISA (descrito en Baranda et al., 2000. Vet. Parasitol. (87) 193-206). Esta prueba dio como resultado lo siguiente:

| Sueros de cerdo | SGE ELISA | OmTSGP1 ELISA |
|---|-----------------------------|-----------------------------|
| Infestados con <i>O. moubata</i> (18) | 18 positivos 0 negativos | 18 positivos 0 negativos |
| Infestados con otros ectoparásitos (8) | 0 positivos 8 negativos | 0 positivos 8 negativos |
| Negativos (20) | 0 positivos 20 negativos | 0 positivos 20 negativos |
| Sensibilidad (Sens) | 100% | 100% |
| Especificidad (Esp) | 100% | 100% |
| (Sens+Esp)/2 | 100% | 100% |

5

Tabla 2. Ensayos mediante técnica ELISA en distintos sueros de cerdo infestados en laboratorio con distintos parásitos. Se han utilizado como antígenos para la detección: SGE y la proteína recombinante OmTSGP1.

10 Si consideramos que la eficiencia diagnóstica es el valor medio de la sensibilidad y la especificidad, es decir, la sensibilidad más especificidad dividida por dos, vemos que la proteína recombinante OmTSGP1 y el extracto completo SGE presentaban idéntica eficiencia diagnóstica con sueros de cerdos experimentales.

15

2.2. Utilización de sueros de animales de campo (cerdos y facoceros).

Tras esta prueba preliminar, la proteína recombinante OmTSGP1 y el SGE se ensayaron con 100 sueros de cerdos de campo, picados por *O. moubata*,
 20 procedentes de granjas infestadas por la garrapata. También con 157 sueros de cerdos y 74 sueros de facoceros, todos ellos negativos, procedentes de zonas donde no existe *O. moubata*.

En la siguiente tabla, se muestran los resultados obtenidos en cada grupo de sueros para OmTSGP1 y SGE, así como la sensibilidad y especificidad de cada uno.

| Sueros | SGE ELISA | OmTSGP1 ELISA |
|--|-------------------------------|------------------------------|
| Cerdos positivos. De granjas con garrapata (100) | 90 positivos 10 negativos | 86 positivos 14 negativos |
| Cerdos negativos. De zonas donde no existe <i>O. moubata</i> (157) | 31 positivos 126 negativos | 2 positivos 155 negativos |
| Facoceros negativos. De zonas donde no existe <i>O. moubata</i> (74) | 1 positivos 73 negativos | 0 positivos 74 negativos |
| Sensibilidad | 90% | 86% |
| Especificidad | 86,1% | 99,1% |
| (Sens+Esp)/2 | 88,05% | 92,55% |

5

Tabla 3. Ensayos mediante técnica ELISA en distintos sueros de cerdo procedentes de granjas donde existe/no existe *O. moubata*. Se han utilizado como antígenos para la detección: SGE y la proteína recombinante OmTSGP1.

- 10 Podemos observar que la proteína recombinante OmTSGP1 presentó una sensibilidad ligeramente inferior al extracto completo, algo previsible debido a que SGE contiene otros antígenos salivales frente a los cuales pueden existir anticuerpos en el suero de los cerdos infestados. Por otro lado, la proteína recombinante OmTSGP1 mostró una especificidad sensiblemente mayor que el
- 15 SGE y presentó una eficiencia diagnóstica superior a la del SGE.

Los resultados obtenidos muestran que a pesar de que SGE proporciona a la serología una sensibilidad y especificidad del 100% en la detección de anticuerpos anti- *O. moubata* y otros ectoparásitos de muestras de suero de

20 cerdos infestados en laboratorio, cuando se prueba en la detección de

anticuerpos anti- *O. moubata* en sueros de cerdo de campo, la serología con estos sueros mostró una reactividad basal superior a la de los sueros de cerdo infestados en laboratorio, lo cual dificultó la discriminación entre sueros positivos con bajo nivel de anticuerpos y sueros negativos.

5

Sin embargo, la proteína recombinante OmTSGP1, mientras que en sueros de cerdo infestados en laboratorio mostró los mismos resultados que SGE, en sueros de cerdo de campo mostró una mayor especificidad en la determinación de anticuerpos anti- *O. moubata*.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 66% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 10 2. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 1, donde dicha secuencia codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 85% de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 15 3. Secuencia nucleotídica según la reivindicación 2, donde dicha secuencia codifica para una secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
- 20 4. Secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha secuencia nucleotídica es SEQ ID NO: 2.
- 25 5. Vector de expresión que comprende la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 6. Producto de expresión de la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. Producto de expresión según la reivindicación 6 donde dicho producto es una secuencia aminoacídica con al menos un 66 % de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
8. Producto de expresión según la reivindicación 7 donde dicho producto es una secuencia aminoacídica con al menos un 85 % de identidad con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 1.
9. Producto de expresión según la reivindicación 8 donde dicho producto es una secuencia aminoacídica de secuencia SEQ ID NO: 1.

10. Anticuerpo aislado capaz de reconocer el producto de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.
- 5 11. Célula transformada que comprende la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el vector de expresión según la reivindicación 5 o el producto de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.
- 10 12. Composición farmacéutica que comprende el vector de expresión según la reivindicación 5, el producto de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 o la célula transformada según la reivindicación 11.
- 15 13. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según la reivindicación 10.
14. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13 que además comprende al menos un excipiente y/o al menos un vehículo farmacológicamente aceptable.
- 20 15. Uso de la secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, del vector de expresión según la reivindicación 5, del producto de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 y/o del anticuerpo según la reivindicación 10 para la detección y/o cuantificación de *O. moubata* en una muestra biológica aislada.
- 25 16. Uso según la reivindicación 15 donde la muestra biológica es suero ó plasma sanguíneo.
- 30 17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16 donde la muestra biológica pertenece a un mamífero.
18. Uso según la reivindicación 17 donde el mamífero es humano o un animal.

19. Uso de la secuencia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, del vector de expresión según la reivindicación 5, del producto de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, del anticuerpo según la reivindicación 10 o de la célula según la reivindicación 11 para la fabricación de un medicamento.
20. Uso según la reivindicación 19 donde el medicamento se utiliza para el prevención y control de una enfermedad transmitida por *O. moubata*.
21. Uso según la reivindicación 20 donde la enfermedad se selecciona de entre la Fiebre recurrente humana endémica de África oriental, la Peste porcina africana o encefalitis virales.
22. Método para la detección y/o cuantificación de *O. moubata* en un sujeto, que comprende:
- a. detectar y/o cuantificar los anticuerpos descritos en la reivindicación 10, en una muestra biológica aislada del sujeto.
23. Método según la reivindicación 22 donde la muestra biológica aislada es suero ó plasma sanguíneo.
24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23, donde la muestra biológica aislada pertenece a un mamífero.
25. Método según la reivindicación 24 donde el mamífero es un humano o un animal.
26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25 donde la detección y/o cuantificación de los anticuerpos se lleva a cabo mediante inmunoensayo.

27. Método según la reivindicación 26 donde en el inmunoensayo se emplea la secuencia aminoacídica que comprende el producto de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.
- 5 28. Método para el diagnóstico de enfermedades transmitidas por *O. moubata* en un sujeto que comprende, además del paso (a) del método según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 27 :
- 10 b. comparar los datos obtenidos en (a) con unos valores de referencia para encontrar una desviación significativa.
- c. atribuir la desviación significativa a la presencia de *O. moubata* en dicho sujeto.
- 15 29. Kit que comprende el producto de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
30. Kit según la reivindicación 29 que además comprende un soporte sólido donde está fijado el producto de expresión según cualquiera de las
- 20 reivindicaciones 7 a 9.
31. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 29 ó 30 para la detección y/o cuantificación de *O. moubata* en una muestra biológica aislada.
- 25
32. Uso del kit según la reivindicación 31 donde la muestra biológica aislada es suero ó plasma sanguíneo.
33. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 31 ó 32, donde la
- 30 muestra biológica aislada pertenece a un mamífero.

34. Uso del kit según la reivindicación 33 donde el mamífero es un humano o un animal.

5 35. Kit que comprende la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el vector de expresión según la reivindicación 5.

FIG.1

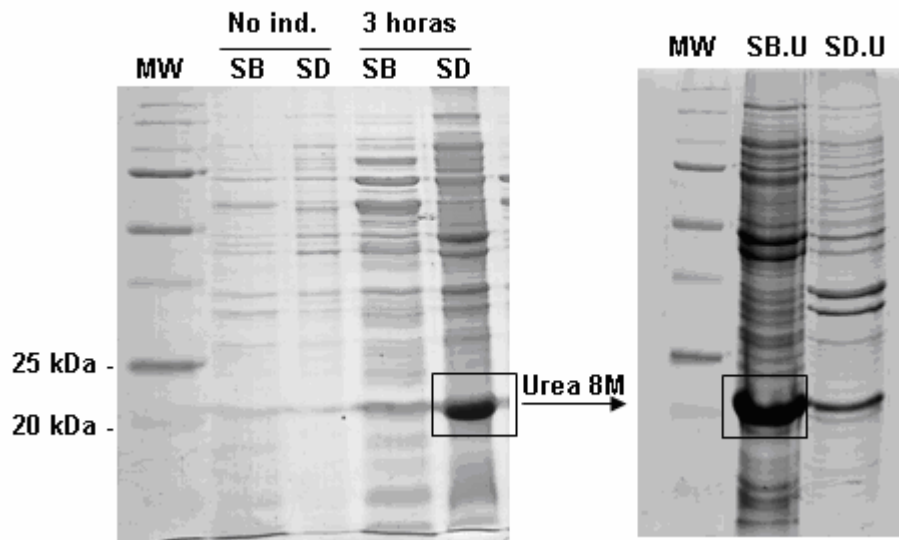
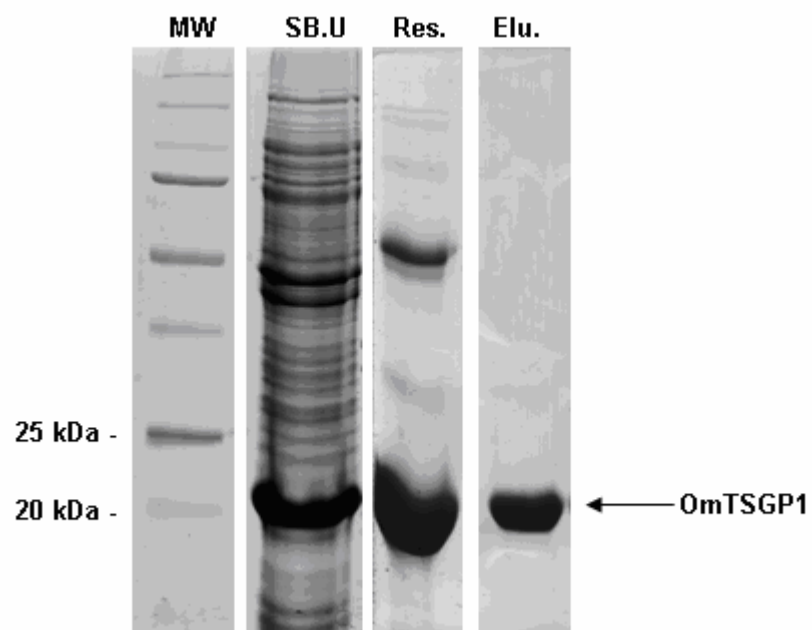


FIG.2



RESUMEN**Antígeno recombinante de la garrapata *Ornithodoros moubata*.**

5

La presente invención se refiere a unas secuencias aminoacídicas útiles para la detección de *Ornithodoros moubata*, al método de detección de *O. moubata* en muestras biológicas utilizando como proteína de detección las secuencias aminoacídicas de la presente invención, a un kit para llevar a cabo dicho método y, finalmente, a un kit para la producción de las secuencias aminoacídicas de forma recombinante.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
- <120> Antígeno recombinante de la garrapata Ornithodoros moubata
- <130> 1641.758
- <160> 21
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 198
- <212> PRT
- <213> Ornithodoros moubata
- <400> 1

Met His Arg Leu Leu Leu Leu Ile Ala Leu Phe Ser Phe Ser Ser
 1 5 10 15

Ala Glu Glu Asn Gln Arg Gly Lys Gly Cys Leu Gly Ser Thr Ala Ala
 20 25 30

Ser Val Ala Val Phe Gly Lys Asp Gly Ser Ala Gly Ser Ala Thr Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ser Tyr Leu Val Lys Thr Thr Tyr Thr Asp Glu His Ser Cys
 50 55 60

Val Tyr Ile Leu Pro Pro His Gly Gln Lys Asp Asn Glu Gly Arg Tyr
 65 70 75 80

Pro Tyr Tyr Met Gly Tyr Lys Asp Glu Gly Asn Gln Trp Lys Lys Ile
 85 90 95

Asn Gly Thr Ile Thr Ile Gln Gly Ser Asn Ile Ser Asp Asn Asp Pro
 100 105 110

Asp Tyr Gly Gln Thr Val Thr Thr Val Leu Tyr Thr His Leu Asp Gly
 115 120 125

Gly Cys Asp Val Thr Thr Phe Gln Gly Ala Thr Gly Asn Asn Asn Val
 130 135 140

Gly Gly Pro Tyr Leu Glu Leu Trp Tyr His Ser Gly Ala Ser Gln Phe
 145 150 155 160

Ala Leu Glu Cys Cys Lys Gly Glu Phe Glu Lys Gln Leu Lys Asn Phe
 165 170 175

Lys Ser Thr Asp Val Arg Glu Ile Asn Gln Gly Cys Asn Tyr Ala Asp
 180 185 190

Val Ile Glu Gln Lys Ser
 195

<210> 2
<211> 597
<212> DNA
<213> Ornithodoros moubata

<400> 2
atgcaccggc tgctactgct actcattgcg ttgttttcgt tcagcagtc tgaagaaaac 60
cagcgtggga agggatgctt gggctctaca gctgctagcg tggctgtatt tggaaaagat 120
ggaagtgcag gatctgcaac tatagggtat tcttaccttg tgaagacaac ctatacggat 180
gaacattctt gtgtttacat tcttccacc catggacaaa aggacaatga aggccgttac 240
ccttactaca tgggatacaa ggatgagggt aatcagtggga agaagataaa tgggacgata 300
accatccagg gcagcaacat cagtgacaat gaccagatt atggacagac tgtaaccaca 360
gtgctataca ctacacttga cggatgatgt gacgttaca ccttccaagg ggcaaccggc 420
aacaacaatg taggaggacc atatcttgag ctgtggtacc atagtggagc aagccagttc 480
gcccttgaat gctgcaaggg agaatttgag aagcaactta agaatttcaa gagcacagac 540
gtccgagaga ttaaccaggg atgtaactat gctgacgtca tcgagcaaaa aagttga 597

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Ornithodoros moubata

<400> 3

Glu His Ser Cys Val Tyr Ile Leu Pro Pro
1 5 10

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador no.1

<400> 4
gagcacagct gcgtgtacat cctgcccccc 30

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de anclaje proporcionado por el kit "5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche)"

<400> 5
gaccacgcgt atcgatgtcg ac 22

<210> 6
<211> 383
<212> DNA
<213> Ornithodoros moubata

<400> 6
gacaaaagga caatgaaggc cgttaccctt actacatggg atacaaggat gagggtaatc 60
agtggaagaa gataaatggg acgataacca tccagggcag caacatcagt gacaatgacc 120
cagattatgg acagactgta accacagtgc tatacactca ccttgacggt ggatgtgacg 180
ttacaacctt ccaaggggca accggcaaca acaatgtagg aggaccatat cttgagctgt 240
ggtaccatag tggagcaagc cagttcggcc ttgaatgctg caagggagaa tttgagaagc 300
aacttaagaa tttcaagagc acagacgtcc gagagattaa ccagggatgt aactatgctg 360
acgtcatcga gcaaaaaagt tga 383

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador no.2

<400> 7
ctatggtacc acagctcaag atatgg 26

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador no.3

<400> 8
ggtcattgtc attgatgttg ctgccc 26

<210> 9
<211> 39
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador de anclaje suministrado por el kit "High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)"

<400> 9
gaccacgctg atcgatgtcg actttttttt tttttttt 39

<210> 10
<211> 334
<212> DNA
<213> Ornithodoros moubata

<400> 10
atgcaccggc tgctactgct actcattgcy ttgttttcgt tcagcagtgc tgaagaaaac 60
cagcgtggga agggatgctt gggctctaca gctgctagcy tggctgtatt tggaaaagat 120
ggaagtgcag gatctgcaac tatagggtat tcttaccttg tgaagacaac ctatacggat 180
gaacattctt gtgtttacat tcttccacc catggacaaa aggacaatga aggccgttac 240
ccttactaca tgggatacaa ggatgagggt aatcagtgga agaagataaa tgggacgata 300

accatccagg gcagcaacat cagtgacaat gacc

334

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador BamH10mTSGP1Fwd

<400> 11
ggatccatgc accggctgct actgctactc

30

<210> 12
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador BamH10mTSGP1Rev

<400> 12
ggatcctcaa cttttttgct cgatgacgctc agc

33

<210> 13
<211> 190
<212> PRT
<213> Ornithodoros savignyi

<400> 13

Met Gln Arg Leu Leu Leu Leu Ile Ala Leu Phe Ser Leu Ser Cys
1 5 10 15

Ala Glu Ala Gly Pro Asp Gly Cys Val Gly Ser Thr Glu Ala Lys Val
20 25 30

Ala Val Phe Gly Glu Gly Gly Asn Ala Gly Ser Pro Thr Ile Gly Tyr
35 40 45

Ser Tyr Leu Val Lys Thr Thr Tyr Pro Asp Glu His Ala Cys Val Tyr
50 55 60

Ile Leu Pro Pro Tyr Gly Thr Ala Asp Ala Ser Gly Arg Tyr Pro Tyr
65 70 75 80

Arg Met Gly Tyr Lys Asp Ser Asn Asp Gln Trp Val Lys Leu Asp Gly
85 90 95

Lys Ile Lys Thr Glu Gly Ser Lys Ile Ile Asp Asn Asp Pro Glu Tyr
100 105 110

Gly Asp Thr Val Thr Thr Val Leu Tyr Thr His Leu Gly Gly Gly Cys
115 120 125

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

Pro Phe Leu Glu Leu Trp Tyr His Ser Gly Ala Ser Glu Glu Ser Met
145 150 155 160

Arg Cys Cys Glu Glu Glu Phe Arg Lys Asn Leu Lys Glu Gly Thr Ala
165 170 175

Val Arg Lys Val Asn Lys Asn Cys Asp Tyr Gly Asp Val Ala
180 185 190

<210> 14
<211> 176
<212> PRT
<213> Ornithodoros parkeri
<400> 14

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

Val His Ala Ala Cys Asn Thr Gly Pro Ile Asp Ala Thr Lys Ser Ile
20 25 30

Ile Gly Pro Gly Ser Gly Lys Tyr Tyr Leu Leu Lys Ser Thr Tyr Lys
35 40 45

Asp Glu Lys Leu Cys Leu Tyr Val Glu Ala Arg Pro Gln Gly Thr Ser
50 55 60

Phe Pro Ala Pro Tyr Pro Phe Gly Tyr Lys Glu Gly Asp Gln Trp Val
65 70 75 80

Ser Lys Thr Gly Thr Val Asn Gly Gln Gly Ala Asn Ile Ile Asp Asn
85 90 95

Asp Asp Glu Phe Gly Glu Thr Asn Thr Thr Leu Val Tyr Ser Asp Tyr
100 105 110

Lys Val Cys Asp Val Gly Leu Phe Arg Gly Asp Lys Val Gly Gly Pro
115 120 125

His Val Glu Leu Trp Lys His Ser Asp Ala Asp Glu Asn Ser Ala Asp
130 135 140

Tyr Lys Cys Cys Thr His Arg Tyr Glu Glu Glu Leu Gln Ala Gln Gly
145 150 155 160

Lys Lys Ser Gln Val Arg Glu Ile Gly Lys Gly Cys Asp Tyr Pro Lys
165 170 175

<210> 15
<211> 176
<212> PRT
<213> Ornithodoros parkeri

<400> 15

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

Val His Ala Ala Cys Asn Thr Gly Ser Ile Asp Ala Thr Lys Ser Ile
20 25 30

Ile Gly Pro Gly Lys Gly Lys Tyr Tyr Leu Leu Lys Ser Thr Tyr Glu
35 40 45

Asp Glu Lys Ser Cys Leu Tyr Val Glu Ala Arg Pro Gln Gly Thr Ser
50 55 60

Phe Pro Ala Gln Tyr Pro Phe Gly Tyr Lys Glu Gly Asp Lys Trp Val
65 70 75 80

Ser Lys Thr Gly Thr Val Asn Gly Gln Gly Ala Asn Ile Ile Asp Lys
85 90 95

Asp Asp Glu Phe Gly Glu Thr Asn Thr Thr Leu Val Tyr Ser Asp Tyr
100 105 110

Lys Val Cys Asp Val Gly Leu Phe His Gly Ala Lys Val Gly Gly Pro
115 120 125

His Val Glu Leu Trp Lys His Ser Asp Ala Asp Glu Asn Ser Ala Glu
130 135 140

Phe Lys Cys Cys Lys Asp Val Tyr Glu Glu Glu Leu Lys Gly Arg Lys
145 150 155 160

Lys Gln Ser Gln Asp Arg Glu Ile Ser Lys Asp Cys Asp Tyr Pro Lys
165 170 175

<210> 16

<211> 177

<212> PRT

<213> Ornithodoros parkeri

<400> 16

Met Leu Gln Val Val Val Phe Leu Thr Gly Cys Cys Phe Val Ala Thr
1 5 10 15

Val His Ala Ala Cys Asn Thr Gly Pro Phe Asp Ala Lys Arg Ser Ile
20 25 30

Ile Gly Pro Gly Lys Gly Glu Tyr Tyr Leu Ala Arg Ser Thr Tyr Glu
35 40 45

Gln Asn Ile Ser Cys Leu Tyr Val Val Pro Pro Pro Glu Gly Thr Glu
50 55 60

Phe Pro Ala Ile Tyr Pro Phe Gly Tyr Lys Glu Gly Asn Lys Trp Val
65 70 75 80

Gln Lys Asn Gly Thr Val Asn Gly Glu Gly Pro Asn Ile Ile Asp Ser
85 90 95

Asp Ala Gly Phe Gly Val Thr Asn Thr Thr Leu Val Tyr Ser Asp Tyr
100 105 110

Lys Glu Cys Asp Val Gly Leu Phe His Gly Glu Lys Val Gly Gly Pro
115 120 125

Tyr Val Glu Leu Trp Lys His Ser Asp Ala Lys Lys Gly Ser Glu Gly
130 135 140

Leu Lys Cys Cys Gln Lys Tyr Phe Arg Lys Glu Leu Glu Lys Gln Gly
145 150 155 160

Lys Ser Lys Thr Asp Phe Lys Arg Val Asp Lys Asn Cys Lys Tyr Pro
165 170 175

Ala

<210> 17

<211> 179

<212> PRT

<213> Ornithodoros parkeri

<400> 17

Met Leu Ser Leu Val Ile Phe Leu Thr Gly Cys Tyr Phe Val Ala Thr
1 5 10 15

Val His Ala Ala Cys Val Asp Gly Pro Tyr Ser Ala Glu Lys Ser Val
20 25 30

Phe Gly Pro Gly Ser Gly Lys Tyr Tyr Leu Val Lys Ser Thr Tyr Pro
35 40 45

Asn Glu Asn Asp Cys Val Tyr Val Val Pro Pro Pro Lys Gly Ser Gln
50 55 60

Phe Pro Ala Lys Tyr Pro Phe Gly Phe Lys Gln Ser Asp Gly Thr Trp
65 70 75 80

Tyr Ser Gly Thr Gly Glu Val Asn Val Asp Gly Pro Asn Ile Leu Asp
85 90 95

Lys Asp Glu Lys Tyr Gly Gln Thr Asn Thr Thr Leu Val Tyr Ser Asp
100 105 110

Tyr Lys Asp Cys Asp Val Gly Leu Phe His Gly Ser Val Gly Gly Pro
7

115

120

125

His Val Glu Leu Trp Arg His Ser Ser Ala Asp Glu Asn Gly Asp Gly
130 135 140

Phe Lys Cys Cys Lys Glu Lys Phe Glu Glu Glu Leu Lys Lys Gln Lys
145 150 155 160

Lys Glu Ser Asp Val Lys Asp Val Gly Gly Gln Lys Cys Asp Tyr Pro
165 170 175

Asn Thr Lys

<210> 18
<211> 156
<212> PRT
<213> Ornithodoros parkeri

<400> 18

Met Leu Gln Val Val Val Phe Leu Thr Gly Cys Cys Phe Val Ala Thr
1 5 10 15

Val His Ala Ala Cys Asn Thr Gly Pro Phe Asp Ala Lys Arg Ser Ile
20 25 30

Ile Gly Pro Gly Lys Gly Glu Tyr Tyr Leu Ala Arg Ser Thr Tyr Glu
35 40 45

Gln Asn Ile Ser Cys Leu Tyr Val Val Pro Pro Pro Glu Gly Thr Glu
50 55 60

Phe Pro Ala Ile Tyr Pro Phe Gly Tyr Lys Glu Gly Asn Lys Trp Val
65 70 75 80

Gln Lys Asn Gly Thr Val Asn Gly Glu Gly Pro Asn Ile Ile Asp Ser
85 90 95

Asp Ala Gly Phe Gly Val Thr Asn Thr Thr Leu Val Tyr Ser Asp Tyr
100 105 110

Lys Glu Cys Asp Val Gly Leu Phe His Gly Glu Lys Val Gly Gly Pro
115 120 125

Tyr Val Glu Leu Trp Lys His Ser Asp Ala Lys Lys Gly Ser Glu Gly
130 135 140

Leu Lys Cys Cys Gln Lys Tyr Ser Gln Glu Gly Thr
145 150 155

<210> 19
<211> 180
<212> PRT

<213> Ornithodoros parkeri

<400> 19

Met Leu Gln Leu Val Ala Leu Ile Ala Gly Cys Cys Ile Val Ala Lys
1 5 10 15

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

Val Gly Pro Gly Thr Gly Lys Leu Tyr Leu Val Lys Ser Thr Tyr Gln
35 40 45

Gln Asp Ile Cys Cys Leu Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Ile Gly Thr Pro
50 55 60

Trp Pro Ala Pro Tyr Pro Phe Gly Tyr Lys Asn Lys Glu Thr Gly Glu
65 70 75 80

Trp Val Lys Arg Thr Gly Thr Val Asp Gly Glu Gly Ala Asn Val Ile
85 90 95

Asp Ser Asp Ser Gly Phe Gly Glu Thr Asn Thr Thr Leu Leu Tyr Ser
100 105 110

Asp Tyr Gln Asn Cys Ala Val Gly Leu Phe His Gly Gly Lys Val Thr
115 120 125

Gly Gly Pro Tyr Leu Glu Leu Phe Lys Tyr Ser Ser Ala Gly Asp Asp
130 135 140

Ser Gln Ala Leu Gln Cys Cys Glu Asn Arg Phe Ala Ala Glu Leu Lys
145 150 155 160

Lys Gln Gly Lys Glu Glu Lys Asp Val Ile Gln Val Asp Lys Asp Cys
165 170 175

Val Tyr Pro Glu
180

<210> 20

<211> 181

<212> PRT

<213> Ornithodoros parkeri

<400> 20

Met Leu Gln Leu Val Ala Phe Ile Ala Gly Cys Cys Ile Val Ala Thr
1 5 10 15

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

Val Gly Pro Gly Thr Gly Lys Leu Tyr Leu Val Lys Ser Thr Cys Gln
35 40 45

Gln Asp Ile Cys Cys Leu Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Thr Gly Thr Pro
50 55 60

Trp Pro Ala Pro Tyr Pro Phe Gly Tyr Lys Asn Lys Ala Thr Gly Glu
65 70 75 80

Trp Val Lys Val Thr Thr Gly Thr Val Asn Gly Glu Gly Ala Asn Val
85 90 95

Ile Asp Ser Asp Ser Gly Phe Gly Glu Thr Asn Thr Thr Leu Leu Tyr
100 105 110

Ser Asp Tyr Gln Asn Cys Ala Val Gly Leu Phe His Gly Gly Lys Val
115 120 125

Thr Gly Gly Pro His Leu Glu Leu Phe Lys Tyr Ser Ser Ala Ala Asp
130 135 140

Asp Ser Gln Ala Leu Gln Cys Cys Glu Gln Arg Phe Ala Ala Glu Leu
145 150 155 160

Glu Lys Gln Gly Lys Thr Ala Thr Asp Val Ile Glu Val Asn Lys Asp
165 170 175

Cys Asp Tyr Pro Glu
180

<210> 21
<211> 116
<212> PRT
<213> Ornithodoros parkeri

<400> 21

Met Val Ser Asn Phe Trp Lys Thr Met Ile Phe Gly Leu Phe Leu Cys
1 5 10 15

Arg Tyr Ser Gly Thr Gly Glu Val Asn Val Asp Gly Pro Asn Ile Leu
20 25 30

Asp Lys Asp Glu Lys Tyr Gly Gln Thr Asn Thr Thr Leu Val Tyr Ser
35 40 45

Asp Tyr Lys Asp Cys Asp Val Gly Leu Phe His Gly Ser Val Gly Gly
50 55 60

Pro His Val Glu Leu Trp Arg His Ser Ser Ala Asp Glu Asn Gly Asp
65 70 75 80

Gly Phe Lys Cys Cys Lys Glu Lys Phe Glu Glu Glu Leu Lys Lys Gln
85 90 95

Lys Lys Glu Ser Asp Val Lys Asp Val Gly Gly Gln Lys Cys Asp Tyr
100 105 110

Pro Asn Thr Lys
115