

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 373**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 33/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2015 PCT/JP2015/065600**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015 WO15182754**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2015 E 15800403 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 3165235**

54 Título: **Proteínas para su uso en el control de ácaros rojos**

30 Prioridad:

30.05.2014 JP 2014113479

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.04.2020

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION
HOKKAIDO UNIVERSITY (100.0%)
Kita 8-jyo Nishi 5-chome, Kita-ku
Sapporo-shi, Hokkaido 060-0808, JP**

72 Inventor/es:

**OHASHI KAZUHIKO;
MURATA SHIRO;
ISEZAKI MASAYOSHI;
KONNAI SATORU;
TANIGUCHI AYAKA y
HOJOH TAKUMI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 757 373 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas para su uso en el control de ácaros rojos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a proteínas para su uso en un método para controlar los ácaros rojos (Dermanyssus gallinae), que son ectoparásitos que parasitan a animales domésticos, en particular a los pollos y a una proteína novedosa que se puede usar en este.

10

Antecedentes de la técnica

El daño resultante de la succión de sangre por los ácaros rojos es un problema importante en las granjas avícolas (particularmente de gallinas ponedoras de huevos) en el mundo. Los ácaros rojos hacen que disminuya la productividad de puesta de huevos de las gallinas, por ejemplo, debido a la anemia, una disminución en la tasa de puesta de huevos y una disminución en la respuesta inmunitaria de las gallinas como resultado de la succión de sangre. También se ha descrito que los ácaros rojos están involucrados en la transmisión de varios patógenos.

15

Los métodos actuales para el control de los ácaros rojos incluyen, por ejemplo, la limpieza a fondo de los gallineros y la pulverización de insecticidas. Sin embargo, dado que los ácaros rojos permanecen en huecos como las grietas en un gallinero aunque no succionan sangre, es difícil controlar por completo los ácaros rojos que permanecen en tales huecos mediante la limpieza o la pulverización química. Además, la pulverización química puede hacer que el medicamento químico permanezca en el producto y, además de eso, se asocia con un problema de generación de ácaros rojos resistentes al medicamento químico, como se ha descrito recientemente. Dado que los métodos actuales para el control de los ácaros rojos, en particular los que se realizan mediante pulverización química, tienen tales problemas, existe la necesidad de un nuevo método para controlar los ácaros rojos, además de la pulverización química.

20

25

Una vacuna contra los ácaros rojos es un medio prometedor como un método alternativo a la pulverización química para el control de los ácaros rojos. Con anterioridad ya se habían realizado investigaciones sobre el desarrollo de vacunas contra las garrapatas para las garrapatas ixódidas, que son ectoparásitos chupadores de sangre de animales domésticos, así como contra los ácaros rojos.

30

Las vacunas contra las garrapatas incluyen, por ejemplo, aquellas en las que una molécula que se inyecta de una garrapata en un hospedador se usa como antígeno de la vacuna, y aquellas en las que una molécula que se expresa en el tracto intestinal de una garrapata y está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis en la garrapata se utiliza como antígeno de vacuna. En el primer caso, la función del factor que se ha inyectado de la garrapata en el hospedador es inhibida por una respuesta inmunitaria dentro del hospedador, de modo que se evita que la garrapata succione sangre y se pueda controlar. En este último caso, una sustancia inmunoactiva del hospedador que se ha introducido en la garrapata succionadora de sangre inhibe la función de la molécula objetivo dentro del cuerpo de la garrapata, de modo que la garrapata está controlada (Bibliografía no de patente 1 y 2). Una vacuna anti-garrapatas que pertenece al tipo anterior es TickGARD (marca registrada) PLUS, que está disponible comercialmente en Hoechst.

40

En los últimos años, también se han realizado investigaciones y desarrollos sobre vacunas contra los ácaros rojos. Por ejemplo, se realizó una prueba con una vacuna en la cual se usan como antígenos las fracciones insolubles y solubles de ácaros rojos adultos (Bibliografía no de patente 3). También se ha descrito una prueba con una vacuna que mostró un cierto efecto, en la cual se usa como antígeno una proteína recombinante codificada por el gen identificado que se expresa en los ácaros rojos (Bibliografía no de patente 4 y 5). Además, siempre se han descrito moléculas que pueden ser antígenos candidatos para vacunas, tales como enzimas antioxidantes y enzimas metabolizadoras de fármacos en los ácaros rojos (Bibliografía no de patente 6 y 7).

45

50

Dado que las garrapatas ixódidas parasitan a un hospedador y continúan succionando la sangre del hospedador durante varios días, también son eficaces las vacunas que evitan que las garrapatas succionen la sangre como consecuencia de una respuesta inmunitaria dentro del hospedador. Por el contrario, el período de succión de sangre de los ácaros rojos es de cinco minutos a, como máximo, aproximadamente una hora, y por lo tanto, los ácaros rojos permanecen en los individuos de pollo solo durante períodos extremadamente cortos, en comparación con las garrapatas ixódidas. Por esta razón, como vacunas contra los ácaros rojos que se puede esperar que sean altamente efectivas en el control de los ácaros rojos, serían más ventajosas aquellas que controlan los ácaros rojos mediante una sustancia inmunoactiva de un hospedador introducida en el cuerpo del ácaro rojo succionador de sangre que las que controlan los ácaros rojos al inhibir la función de una molécula derivada de los ácaros rojos a través de una respuesta inmunitaria dentro del hospedador. Sin embargo, actualmente, no se ha encontrado un antígeno de vacuna eficaz que pueda controlar los ácaros rojos a través de dicho mecanismo.

55

60

Lista de citas

65

Bibliografías no de patente

Bibliografía no de patente 1: Onuma et al., Journal of Veterinary Medicine, 2004, Vol. 57, 753-757.
 Bibliografía no de patente 2: Willadsen et al., Parasitology, 2004, Vol. 129, S367-S387.
 Bibliografía no de patente 3: Wright et al., Exp. Appl. Acarol., 2009, Vol. 48, 81-91.
 5 Bibliografía no de patente 4: Bartley et al., International Journal for Parasitology, 2009, Vol. 39, 447-456.
 Bibliografía no de patente 5: Bartley et al., Parasitology, 2012, Vol. 139, 755-765.
 Bibliografía no de patente 6: Isezaki et al., September 18, 2010, the 150th Japanese Society of Veterinary Science, presentation number C-52.
 10 Bibliografía no de patente 7: Isezaki et al., September 15, 2012, the 154th Japanese Society of Veterinary Science, presentation number C-2.

Sumario de la invención

Problema técnico

15 La presente invención está definida por las reivindicaciones. La presente invención tiene como objetivo proporcionar el control de los ácaros rojos provocando una respuesta inmunitaria contra ellos en un animal doméstico para inhibir la función de la molécula objetivo dentro del cuerpo de los ácaros rojos, y un antígeno de vacuna y una vacuna contra los ácaros rojos que pueden usarse para ello.

Solución al problema

20 Los presentes inventores han revelado la expresión de genes que codifican proteínas novedosas características de los ácaros rojos mediante análisis de expresión génica, y han realizado la invención, cuyas realizaciones se exponen a continuación. La presente divulgación que comprende la invención se refiere a las proteínas reivindicadas para el uso en los siguientes métodos:

- (1) Un método para provocar una respuesta inmunitaria específica de los ácaros rojos en un animal doméstico, que comprende la etapa de administrar al animal doméstico una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1, una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2, y/o un equivalente inmunológico de la misma.
 30 (2) El método de acuerdo con (1), en el que el equivalente inmunológico es un fragmento polipeptídico de una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1 o una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2).
 35 (3) El método de acuerdo con (1), en el que el equivalente inmunológico es

una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se eliminan o sustituyen de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1,
 40 una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se insertan de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1,
 una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se eliminan o sustituyen de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2,
 una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se insertan de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2, o
 45 un fragmento polipeptídico de la misma.

- (4) El método de acuerdo con (1), en el que el equivalente inmunológico es una proteína de fusión que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se añaden uno o más aminoácidos opcionales en el extremo N y/o C de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las siguientes:

50 la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1,
 una secuencia de aminoácidos en la cual se eliminan o sustituyen de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1,
 una secuencia de aminoácidos en la cual se insertan de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1,
 55 la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2,
 una secuencia de aminoácidos en la cual se eliminan o sustituyen de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2,
 una secuencia de aminoácidos en la cual se insertan de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2,
 60 aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2,

o una secuencia de aminoácidos parcial de la misma.

- (5) Una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de a) a d) descritos a continuación, o un fragmento polipeptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos parcial de la secuencia de aminoácidos de a) a c) descritos a continuación, en la que la proteína o el fragmento polipeptídico es un equivalente inmunológico de una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1:

- a) la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1,
- b) una secuencia de aminoácidos en la cual se eliminan o sustituyen de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1,
- c) una secuencia de aminoácidos en la cual se insertan de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1,
- d) una secuencia de aminoácidos en la cual se añaden uno o más aminoácidos opcionales en el extremo N y/o C de la secuencia de aminoácidos o una secuencia de aminoácidos parcial de cualquiera de a) a c).

(6) Una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de e) a h) descritos a continuación, o un fragmento polipeptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos parcial de la secuencia de aminoácidos de e) a g) descritos a continuación, en la que la proteína o el fragmento polipeptídico es un equivalente inmunológico de una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2:

- e) la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2,
- f) una secuencia de aminoácidos en la cual se eliminan o sustituyen de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2,
- g) una secuencia de aminoácidos en la cual se insertan de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2,
- h) una secuencia de aminoácidos en la cual se añaden uno o más aminoácidos opcionales en el extremo N y/o C de la secuencia de aminoácidos o una secuencia de aminoácidos parcial de cualquiera de e) a g).

(7) Un ácido nucleico que codifica la proteína o el fragmento polipeptídico de la misma como se define en (5) o (6).

(8) Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de acuerdo con (7).

(9) Una vacuna contra los ácaros rojos para su uso en un animal doméstico, que comprende la proteína o el fragmento polipeptídico como se define en (5) y/o (6), o el ácido nucleico como se define en (7) y/o el vector de expresión como se define en (8).

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con la presente invención, se puede provocar una respuesta inmunitaria específica de los ácaros rojos en un animal doméstico, y los ácaros rojos se pueden controlar inhibiendo la función de la molécula objetivo dentro de los ácaros rojos que han succionado la sangre del animal doméstico.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la catepsina L-2 del ácaro rojo (*Dermanyssus gallinae*) expuesta en la SEQ ID NO. 1 y de la catepsina L de varias especies de garrapatas y ácaros. En la figura, los triángulos en negro invertidos representan una secuencia de motivos característicos de la catepsina L.

La Fig. 2 representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la ferritina 2 del ácaro rojo (*Dermanyssus gallinae*) expuesta en la SEQ ID NO. 2 y de la ferritina 2 de varias especies de garrapatas y ácaros.

La Fig. 3 representa una fotografía de un gel de SDS-PAGE de una proteína de fusión de la catepsina L-2 de *Dermanyssus gallinae* y del factor de activación derivado de *Escherichia coli* de un gel de SDS-PAGE de una proteína de fusión de ferritina 2 de *Dermanyssus gallinae* y del factor de activación derivado de *Escherichia coli* en el panel de la derecha.

La Fig. 4 representa una fotografía de un gel de SDS-PAGE de una proteína de fusión de una porción que contiene el sitio activo de la catepsina L-2 de *Dermanyssus gallinae* y un factor de activación derivado de *Escherichia coli*.

La Fig. 5 representa una fotografía de electroforesis en gel de agarosa que muestra los resultados de la RT-PCR realizada utilizando ARN totales de tres muestras de ácaros *Dermanyssus gallinae* recogidos en diferentes granjas avícolas y una muestra de control de ácaros *Ornithonyssus sylviarum* como molde y los conjuntos de cebadores a) toc) diseñados para amplificar el ácido nucleico que codifica la catepsina L-2 de *Dermanyssus gallinae*. En el panel superior, los carriles 1 a 3 corresponden a muestras de *D. gallinae*, y el carril 4 corresponde a una muestra de *O. sylviarum*. El panel inferior es una representación esquemática que muestra la relación entre las ubicaciones de los cebadores de cada conjunto de cebadores y los fragmentos a amplificar con los conjuntos de cebadores.

La Fig. 6 representa gráficos que muestran la tasa de mortalidad (el número de ácaros *Dermanyssus gallinae* muertos por succión de sangre en relación con el número de ácaros *Dermanyssus gallinae* que han succionado sangre) de los ácaros *Dermanyssus gallinae* que han succionado una sangre de prueba preparada a partir de pollos inmunizados con catepsina L-2 o ferritina 2 de *Dermanyssus gallinae* en las semanas 1 y 3 después de la succión de sangre.

La Fig. 7 representa gráficos que muestran la tasa de mortalidad (el número de ácaros *Dermanyssus gallinae* muertos por succión de sangre en relación con el número total de ácaros *Dermanyssus gallinae* que han succionado y que no han succionado sangre) de los ácaros *Dermanyssus gallinae* que han succionado una sangre de prueba preparada a partir de pollos inmunizados con catepsina L-2 o ferritina 2 de *Dermanyssus gallinae* durante un período de hasta 14 días después de la succión de sangre.

Descripción de realizaciones

La presente divulgación que comprende la invención se refiere a un método para provocar una respuesta inmunitaria específica de los ácaros rojos (*Dermanyssus gallinae*) en un animal doméstico, que comprende la etapa de administrar al animal doméstico una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1, una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2, y/o un equivalente inmunológico de la misma como se define por las reivindicaciones.

Se determinó que una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1 es la catepsina L, un tipo de cisteína proteasa, basándose en una pluralidad de secuencias de motivos característicos contenidos en su secuencia de aminoácidos. En relación con esto, el ácido nucleico clonado en la presente invención (SEQ ID NO. 3) codifica una proteína que tiene una secuencia señal de 18 restos de aminoácidos añadidos en el extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1).

De los ácaros rojos, ya se ha clonado un gen que codifica la catepsina L (Bartley et al., Bibliografía no de patente 5, supra), y se ha registrado en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) con el Número de acceso No. CCC33064.1. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de bases de SEQ ID NO. 3 muestra solo una identidad del 30,6% con la del Número de acceso CCC33064.1. La identidad de una secuencia de aminoácidos en la memoria descriptiva significa el porcentaje de identidad de secuencia más alto obtenido mediante un alineamiento de secuencias para comparar usando un programa de software apropiado que habitualmente usan los expertos en la materia, como la búsqueda BLAST del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Se realizó una búsqueda de homología en GenBank utilizando la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de bases de SEQ ID NO. 3 como una secuencia de consulta y se determinó que la catepsina L de *Metaseiulus occidentalis* (Número de acceso XP_003745143.1, SEQ ID NO. 5) tiene una identidad del 72,9 %, la catepsina L de *Ixodes scapularis* (Número de acceso XP_002403652.1, SEQ ID NO. 6) tiene una identidad del 51,8 % y la catepsina L de *Rhipicephalus appendiculatus* (Número de acceso AAO60045.1, SEQ ID NO. 7) tiene una identidad del 46,6 %, respectivamente con la secuencia de consulta. Sin embargo, no se detectaron secuencias de aminoácidos conocidas que mostraran una identidad mayor que las de estas secuencias en los miembros del orden Acari.

Basándose en estos resultados, se determinó que una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1 era una catepsina L novedosa que se expresa específicamente en el ácaro rojo *Dermanyssus gallinae*. En lo sucesivo en el presente documento, la catepsina de la presente invención que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1 se denomina catepsina L-2 y se abrevia como DgCatL-2, y la catepsina L de *Dermanyssus gallinae* conocida registrada con el Número de acceso CCC33064.1 se denomina catepsina L-1 y se abrevia como DgCatL-1.

Se determinó que una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2 es la ferritina 2, que está involucrada en el transporte y almacenamiento de hierro, basándose en las secuencias de motivos característicos contenidos en su secuencia de aminoácidos. La ferritina es una proteína de almacenamiento de hierro que está ampliamente presente en especies que van desde los ácaros y las garrapatas hasta los animales mamíferos: se ha descrito que los ácaros y las garrapatas tienen ferritinas 1 y 2, mientras que los animales mamíferos tienen una ferritina correspondiente a la ferritina 1 de los ácaros y las garrapatas. La ferritina de la presente invención que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2 es una proteína que corresponde a la ferritina 2. En relación con esto, el ácido nucleico que se ha clonado en la presente invención (SEQ ID NO. 4) codifica una proteína que tiene una secuencia señal de 18 restos de aminoácidos añadidos en el extremo N de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2).

Se realizó una búsqueda de homología en GenBank utilizando la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de bases de SEQ ID NO. 4 como una secuencia de consulta y se determinó que la ferritina 2 de *Metaseiulus occidentalis* (Número de acceso XP_003737398.1, SEQ ID NO. 8) tiene una identidad del 59,0 %, la ferritina 2 de *Ixodes ricinus* (Número de acceso ACJ70653.1, SEQ ID NO. 9) tiene una identidad del 49,5 %, la ferritina 2 de *Ixodes persulcatus* (Número de acceso AGX01000.1, SEQ ID NO. 10) tiene una identidad del 49,5 %, y la ferritina 2 de *Haemaphysalis longicornis* (Número de acceso BAN13552.1, SEQ ID NO. 11) tiene una identidad del 48,2 %, respectivamente con la secuencia de consulta. Sin embargo, no se detectaron secuencias de aminoácidos conocidas que mostraran una identidad mayor que las de estas secuencias en los miembros del orden Acari.

Basándose en estos resultados, se determinó que una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2 era una ferritina 2 novedosa que se expresa específicamente en el ácaro rojo *Dermanyssus gallinae*. En lo sucesivo en el presente documento, la ferritina 2 de la presente invención que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2 se abrevia como DgFER2.

Se supone que las DgCatL-2 y DgFER2 anteriormente descritas son cada una de ellas una proteína involucrada en la digestión y absorción de la sangre del hospedador que se ha incorporado en la sangre de un ácaro rojo. Se espera que la inhibición de la función de estas proteínas haga que la ingesta de nutrientes de los ácaros rojos sea insuficiente, de modo que los ácaros rojos pueden controlarse. Específicamente, se espera que induzca la producción dentro del

hospedador de varios materiales que exhiben una respuesta inmunitaria específica de DgCatL-2 o DgFER2, tales como anticuerpos específicos, linfocitos T citolíticos, linfocitos T cooperadores y linfocitos NKT, es decir, la provocación de una respuesta inmunitaria específica de *Dermanyssus gallinae* en el hospedador, permite controlar los ácaros rojos.

Además de DgCatL-2 y DgFER2, en la presente invención se pueden usar los equivalentes inmunológicos de las mismas. Un equivalente inmunológico como se usa en la presente invención significa una proteína o polipéptido inmunogénico que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria específica de *Dermanyssus gallinae* dirigida a DgCatL-2 o DgFER2 como antígeno diana en un animal doméstico. Preferiblemente, los ejemplos preferibles y no limitantes de dicho equivalente inmunológico pueden incluir los siguientes b) a d) y f) a h).

b) Una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se eliminan o sustituyen de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1 (una proteína correspondiente a una variante de delección o sustitución de DgCatL-2) o un fragmento polipeptídico de la misma.

c) Una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se insertan de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1 (una proteína correspondiente a una variante de inserción de DgCatL-2) o un fragmento polipeptídico de la misma.

d) Una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se añade uno o más aminoácidos opcionales en el extremo N y/o C de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de DgCatL-2 o las proteínas descritas en los b) o c) anteriores o fragmentos polipeptídicos de la misma (una proteína de fusión de DgCatL-2 o la proteína descrita en los b) o c) anteriores con otra proteína o polipéptido o una secuencia de etiqueta).

f) Una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se eliminan o sustituyen de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2 (una proteína correspondiente a una variante de delección o sustitución de DgFER2) o un fragmento polipeptídico de la misma.

g) Una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se insertan de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2 (una proteína correspondiente a una variante de inserción de DgFER2) o un fragmento polipeptídico de la misma.

h) Una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se añaden uno o más aminoácidos opcionales en el extremo N y/o C de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de DgFER2 o las proteínas descritas en los f) o g) anteriores o fragmentos polipeptídicos de la misma (una proteína de fusión de DgFER2 o la proteína descrita en los apartados anteriores f) o g) con otra proteína o polipéptido o una secuencia de etiqueta).

Los ejemplos representativos de una secuencia de aminoácidos opcional que se agregará como una porción de las proteínas de fusión mencionadas anteriormente en la presente invención pueden incluir, aunque sin limitación, secuencias de etiqueta tales como DYKDDDDK y etiquetas de His, y secuencias de aminoácidos de proteínas, tales como el factor de activación de *Escherichia coli*, hemocianina de lapa californiana, hemaglutinina, c-myc, proteínas fluorescentes y glutatión S-transferasa.

En la presente divulgación que comprende la invención, DgCatL-2, DgFER2, y/o equivalentes inmunológicos de la misma, preferiblemente proteínas descritas en los b) a d), y f) a h) anteriores, se usan como un antígeno para provocar una respuesta inmunitaria de *Dermanyssus gallinae* en un hospedador. No se requiere necesariamente un equivalente inmunológico para retener la actividad proteasa de DgCatL-2 o la función de DgFER2 como una proteína de almacenamiento de hierro en la presente invención.

Por tanto, por ejemplo, en los equivalentes inmunológicos correspondientes a las variantes DgCatL-2 o DgFER2, no hay limitaciones particulares en el sitio de sustitución, delección y/o inserción de aminoácidos, el tipo de restos de aminoácidos después de la mutación y las secuencias de aminoácidos a añadir excepto el porcentaje de identidad de secuencia. La secuencia de aminoácidos de una variante inmunológica equivalente tiene una identidad de al menos 80 % o más, o 90 % o más, además deseablemente 95 % o más, con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1 o 2. Los fragmentos polipeptídicos tienen no menos de 30 restos de aminoácidos.

Además, DgCatL-2, DgFER2 y sus equivalentes inmunológicos pueden modificarse con sustancias fluorescentes tales como FITC, agentes de reticulación y otras sustancias químicas conocidas, siempre que retengan la inmunogenicidad. La selección de las sustancias químicas con las que se pueden modificar las proteínas, y sus modificaciones pueden estar dentro de la capacidad normal de un experto en la materia.

DgCatL-2, DgFER2 y sus equivalentes inmunológicos en la presente invención pueden producirse usando procedimientos de recombinación genética conocidos o bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos procedimientos de recombinación genética pueden llevarse a cabo utilizando los procedimientos descritos en una variedad de libros de texto y manuales, normalmente en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Press (2001), y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), y los habitualmente utilizados por los expertos en la materia. Los kits o reactivos experimentales comercialmente disponibles pueden usarse de acuerdo con los protocolos de los fabricantes.

DgCatL-2, DgFER2 y sus equivalentes inmunológicos en la presente invención pueden producirse como proteínas recombinantes incorporando un ácido nucleico que contiene la secuencia de bases que codifica cada una de estas en un vector de expresión apropiado, y expresando el ácido nucleico en una célula hospedadora, mediante métodos de

ingeniería genética de uso común. El vector de expresión puede contener además cualquier secuencia de bases funcional para regular la transcripción y la expresión, como una secuencia promotora, una secuencia de operador, un sitio de unión al ribosoma, una señal de poliadenilación y un potenciador. Estas secuencias de bases funcionales pueden estar operativamente unidas al ácido nucleico descrito anteriormente.

5 Como se ha descrito anteriormente, en la presente invención, DgCatL-2, DgFER2 y sus equivalentes inmunológicos no son necesariamente necesarios para retener actividades fisiológicas, tales como actividad proteasa o una función como una proteína de almacenamiento de hierro. Por tanto, cuando estas proteínas son producidas por procedimientos de ingeniería genética, no se requiere que se expresen como proteínas que retienen la actividad fisiológica
10 mencionada anteriormente. Por ejemplo, DgCatL-2, DgFER2 y sus equivalentes inmunológicos pueden producirse en forma de los llamados cuerpos de inclusión que pueden generarse cuando se expresa una proteína heteróloga utilizando *Escherichia coli* como célula hospedadora.

15 Las proteínas relativamente pequeñas, como los fragmentos polipeptídicos, se pueden sintetizar mediante métodos de síntesis química bien conocidos por los expertos en la materia, como los métodos Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonilo) y tBoc (t-butiloxycarbonilo), o utilizando sintetizadores de péptidos disponibles comercialmente.

Además, DgCatL-2, DgFER2 y sus equivalentes inmunológicos pueden expresarse de manera recombinante con una secuencia señal añadida en el extremo N de cada uno de estos. Los ejemplos de una secuencia de señal incluyen las
20 secuencias señal de la propia DgCatL-2 (SEQ ID NO. 24) y la propia DgFER2 (SEQ ID NO. 25), que se usan preferiblemente, aunque se puede usar una secuencia señal diferente según sea apropiado, dependiendo de la célula hospedadora que se utilizará.

Un método de la presente divulgación que comprende la invención para provocar una respuesta inmunitaria específica
25 de los ácaros rojos en un animal doméstico comprende la etapa de administrar al animal doméstico una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1, una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2, y/o un equivalente inmunológico de la misma, es decir, DgCatL-2, DgFER2 y/o un equivalente inmunológico de las mismas como se describe anteriormente.

30 La presente invención se puede aplicar ampliamente a animales domésticos en los cuales se requiere el control de los ácaros rojos, y se aplica preferiblemente a aves de corral, tal como pollos, aves silvestres, patos domésticos, patos, gansos, gansos silvestres, pavos, pintadas, faisanes, faisanes dorados y codornices, particularmente pollos, incluidos para huevos, para alimento u ornamentales.

35 Cuando se administran a un animal doméstico, DgCatL-2, DgFER2 y/o un equivalente inmunológico de las mismas se formula preferiblemente y se usa como formas unitarias apropiadas en combinación con excipientes, adyuvantes y otros componentes farmacéuticamente aceptables. Dicha formulación puede estar dentro de la habilidad normal de una persona experta en la materia. En cuanto a las vías de administración, se pueden seleccionar métodos adecuados dependiendo de las formas farmacéuticas y dichos métodos pueden incluir la administración de gotas oftálmicas,
40 administración de gotas nasales, administración en aerosol, administración por atomización, administración en el agua de bebida, administración oral, administración mezclada con el alimento, administración en huevos, punción, inyección intramuscular, inyección subcutánea, y otros. Los métodos particularmente preferidos para la administración en la presente invención son punción, inyección intramuscular, inyección subcutánea, y otros.

45 La provocación de la respuesta inmunitaria específica de *Dermanyssus gallinae* en un animal doméstico al que se le ha administrado DgCatL-2, DgFER2 y/o un equivalente inmunológico de las mismas puede confirmarse detectando la producción de, por ejemplo, un anticuerpo específico, linfocitos T citolíticos, linfocitos T cooperadores y linfocitos NKT que exhiben respuesta inmunitaria a DgCatL-2 o DgFER2, dentro del hospedador o en muestras de sangre periférica o líquido linfático recogido del hospedador. La detección de dicho anticuerpo o tipos de células puede estar dentro de
50 la capacidad normal de una persona experta en la materia.

La presente invención también proporciona DgCatL-2, DgFER2 y un equivalente inmunológico de las mismas y ácidos nucleicos, vectores de expresión y células hospedadoras transformadas que codifican las mismas que se pueden usar en el método para provocar una respuesta inmunitaria específica de los ácaros rojos en un animal doméstico. Estas
55 son útiles como vacunas que permiten provocar la respuesta inmunitaria específica de *Dermanyssus gallinae* en un hospedador. Los detalles de DgCatL-2, DgFER2 y un equivalente inmunológico de las mismas y los ácidos nucleicos, vectores de expresión y células hospedadoras, etc., y además, los métodos para producirlos, y otros, son como se ha descrito anteriormente, incluidos sus ejemplos preferidos. Un ácido nucleico o vector de expresión mencionado anteriormente, particularmente un vector de expresión que funciona dentro del cuerpo de las aves de corral, como los
60 pollos, también se pueden usar como la llamada vacuna de ADN contra los ácaros rojos.

La capacidad de controlar los ácaros rojos a través de la respuesta inmunitaria específica de *Dermanyssus gallinae* provocada por la administración a un animal doméstico de DgCatL-2, DgFER2 y un equivalente inmunológico de las mismas como se describe en la presente invención puede evaluarse mediante métodos simples. Específicamente, se
65 puede evaluar, por ejemplo, mediante un método que comprende preparar una sangre recogida de pollos criados durante un período de tiempo que es el generalmente requerido para inducir una respuesta inmunitaria después de la

administración de DgCatL-2, DgFER2 y un equivalente inmunológico de las mismas, permitiendo que los ácaros rojos chupen la sangre recogida y después determinando las muertes de los ácaros con el tiempo. En este método, dado que la piel de pollo es necesaria para la succión de sangre por los ácaros rojos, es preferible utilizar un sistema de succión de sangre artificial en el que se proporciona un trozo de piel de pollo como parte de una pared divisoria, la sangre se retiene para estar en contacto con la pared divisoria y los ácaros rojos se colocan en el lado opuesto de la pared divisoria, permitiendo así que los ácaros rojos chupen libremente la sangre a través de la pared divisoria. Tal sistema puede construirse dentro de la capacidad normal de una persona experta en la materia, y modificarse y usarse según sea apropiado.

La presente invención se describirá adicionalmente en detalle con referencia a los ejemplos que siguen.

Ejemplos

<Ejemplo 1> Clonación de DgCatL-2

1) Síntesis de ADNc

Se usaron procedimientos de rutina para sintetizar ADNc de la fracción de ARNm extraída de los cuerpos de ácaros *Dermanyssus gallinae*. Usando ADNc como molde, se utilizó el sistema 3' RACE para amplificar un gen que codifica la acetilcolinesterasa (Ace) de *Dermanyssus gallinae* con el kit 3' RACE (Sistema 3' RACE para la amplificación rápida de extremos de ADNc) de Life Technologies. La 1ª ronda de PCR se realizó usando un cebador F1 (SEQ ID NO. 12) diseñado para amplificar un gen que codifica la Ace y un cebador AUAP (un cebador contenido en el kit 5' RACE y 3' RACE (3' RACE / 5' RACE Sistema para la amplificación rápida de extremos de ADNc) de Life Technologies). Además, la PCR anidada se realizó utilizando los fragmentos de ADN amplificados como molde, y otro cebador F2 (SEQ ID NO. 13) diseñado para amplificar un gen que codifica la Ace y el cebador AUAP.

2) Secuenciación de fragmentos de ADN y búsqueda de homología

Se secuenció un fragmento de amplificación de 1,2 kbp obtenido mediante dos rondas de PCR, y se buscó la secuencia de aminoácidos codificada por este fragmento con BLAST para analizar la conservación de motivos o dominios característicos. El análisis reveló que en la secuencia de aminoácidos codificada, había tres motivos de secuencias de aminoácidos característicos de la familia de la catepsina L (que corresponden a las porciones indicadas por los triángulos negros invertidos en la Fig. 1).

3) Determinación de la secuencia de longitud completa

Utilizando la secuencia de bases obtenida, se usó el kit 5' RACE (Sistema 5' RACE para la amplificación rápida de extremos de ADNc) de Life Technologies para llevar a cabo la identificación con 5' RACE de un ADNc de longitud completa. La secuenciación del ADNc con un secuenciador de ADN determinó la secuencia de bases expuesta en la SEQ ID NO. 3, que codifica una proteína que tiene una secuencia señal de 18 aminoácidos añadidos en el extremo N de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1.

Además, se realizó una búsqueda de homología con el programa BLAST en GenBank usando la secuencia de aminoácidos (incluida la secuencia señal) codificada por la secuencia de bases determinada como una secuencia de consulta. Los resultados de la búsqueda de homología con el programa BLAST revelaron que la catepsina L de *Metaseiulus occidentalis* (Número de acceso XP_003745143.1) tiene una identidad del 72,9 %, la catepsina L de *Ixodes scapularis* (Número de acceso XP_002403652.1) tiene una identidad del 51,8 % y la catepsina L de *Rhipicephalus appendiculatus* (Número de acceso AAO60045.1) tiene una identidad del 46,6 %, respectivamente con la secuencia de consulta. El resultado de un alineamiento de estas cuatro secuencias de aminoácidos se muestra en la Fig. 1. Por otro lado, la secuencia de consulta muestra solo una identidad del 30,6 % con la catepsina L derivada de *Dermanyssus gallinae* conocida (DgCatL-1, Número de acceso GenBank CCC33064.1).

A partir de lo anterior, se estableció que una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO 1 (DgCatL-2) es una proteína novedosa, que es diferente de la DgCatL-1 derivada de *Dermanyssus gallinae* conocida.

<Ejemplo 2> Clonación de DgFER2

1) Determinación de DgFER2 de longitud completa

Se usaron procedimientos de rutina para sintetizar ADNc de la fracción de ARNm extraída de los cuerpos de ácaros *Dermanyssus gallinae*. Se realizó la PCR usando ADNc como molde y cebadores F2 (SEQ ID NO. 14) y R2 (SEQ ID NO. 15) diseñados como referencia con las secuencias de bases de genes FER2 de la garrapata. Utilizando el fragmento amplificado, se utilizó la técnica 5' RACE y 3' RACE con los kits anteriormente mencionados de Life Technologies y la secuencia de longitud completa resultante se sometió a secuenciación. Además, se prepararon los cebadores F1 y R1 representados por las SEQ ID NOs. 16 y 17, respectivamente, basándose en la secuencia

determinada y se realizó la PCR utilizando los ADNc como molde. La secuenciación del fragmento de ADN amplificado determinó una secuencia de bases expuesta en la SEQ ID NO. 4, que codifica una proteína que tiene una secuencia señal de 18 aminoácidos añadidos en el extremo N de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2.

5 2) Búsqueda de homología

Se realizó una búsqueda de homología en GenBank usando la secuencia de aminoácidos (incluida la secuencia señal) codificada por la secuencia de bases determinada como una secuencia de consulta. Los resultados de la búsqueda de homología revelaron que la ferritina 2 de *Metaseiulus occidentalis* (Número de acceso XP_003737398.1) tiene una
10 identidad del 59,0 %, la ferritina 2 de *Haemaphysalis longicornis* (Número de acceso BAN13552.1) tiene una identidad del 48,2 %, la ferritina 2 de *Ixodes ricinus* (Número de acceso ACJ70653.1) tiene una identidad del 49,5 % y la ferritina 2 de *Ixodes persulcatus* (Número de acceso AGX01000.1) tiene una identidad del 49,5 %, respectivamente con la secuencia de consulta. A partir de estos resultados de la búsqueda de homología, se determinó que una proteína que
15 consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2 es la FER2 de *Dermanyssus gallinae*. El resultado de un alineamiento de estas cinco secuencias de aminoácidos se muestra en la Fig. 2.

<Ejemplo 3> Producción de DgCatL-2 y DgFER2

Una secuencia de ADN que consiste en una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ
20 ID NO. 1 determinada en el Ejemplo 1 se incorporó en pCold-TF (TaKaRa), un vector de expresión para células de *Escherichia coli*. Asimismo, una secuencia de ADN que consiste en una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2 determinada en el Ejemplo 2 se incorporó en pCold-TF (TaKaRa). Estas recombinaciones genéticas permiten que DgCatL-2 y DgFER2 sin sus secuencias señal se expresen como proteínas de fusión con una chaperona de *Escherichia coli*, el factor de activación (TF; con un peso molecular de 48 kDa), que
25 es una etiqueta solubilizante.

Después de que la expresión de cada gen recombinante fue inducida por choque frío, las proteínas de fusión se purificaron por cromatografía de afinidad contra la secuencia de la etiqueta His, y luego se sometieron a SDS-PAGE. En la Fig. 3 se muestra una fotografía que muestra un gel después de la electroforesis.

Además, para DgCatL-2, se incorporó una secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos que va desde el aminoácido 314 hasta el extremo C de la SEQ ID NO. 1 en el vector descrito anteriormente, pCold-TF, para expresar una proteína de fusión de un fragmento peptídico que contiene el sitio del centro activo de DgCatL-2 y TF (Fig. 4). La proteína de fusión se purificó por cromatografía de afinidad contra la secuencia de la etiqueta His, y luego se sometió a SDS-PAGE. En la Fig. 4 se muestra una fotografía que muestra un gel después de la electroforesis.

<Ejemplo 4> Expresión de DgCatL-2 en ácaros *Dermanyssus gallinae*

Las fracciones de ARN totales se prepararon a partir de ácaros *Dermanyssus gallinae* recogidos en tres granjas
40 avícolas diferentes. Se preparó el conjunto de cebadores a de un cebador directo que consiste en la secuencia de bases expuesta en la SEQ ID NO. 18 y un cebador inverso que consiste en la secuencia de bases expuesta en la SEQ ID NO. 19, el conjunto de cebadores b de un cebador directo que consiste en la secuencia de bases expuesta en la SEQ ID NO. 20 y un cebador inverso que consiste en la secuencia de bases expuesta en la SEQ ID NO. 21, y un conjunto de cebadores c de un cebador directo que consiste en la secuencia de bases expuesta en la SEQ ID NO. 22
45 y un cebador inverso que consiste en la secuencia de bases expuesta en la SEQ ID NO. 23 para realizar la RT-PCR utilizando los ARN totales como molde. Los resultados de la electroforesis en gel de agarosa de fragmentos amplificados se muestran en la Fig. 5.

Se detectaron fragmentos amplificados de tamaños esperados para cada una de las tres muestras de ácaros
50 *Dermanyssus gallinae* y para cada uno de los conjuntos de cebadores a a c. Paralelamente, la RT-PCR se realizó de manera similar utilizando ARN total de los ácaros *Ornithonyssus sylviarum* como control, pero no se detectó ningún fragmento amplificado.

<Ejemplo 5> Prueba de administración de la vacuna

55 1) Preparación de plasma inmunizado con proteína recombinante

Se disolvieron en tampón TF, y las proteínas de fusión de TF y CatL-2 (TF-CatL2), TF y un fragmento de péptido que contiene el sitio del centro activo de CatL-2 (TF-CatL2PD), y TF y DgFER2 (TF-FER2) que se habían purificado en el
60 Ejemplo 3 para preparar sus respectivas soluciones de 0,25 mg/ml.

A 100 µl de cada una de las soluciones se le añadió el mismo volumen de ADYUVANTE GERBU (GERBU) y la mezcla se administró intraperitonealmente a pollos Boris Brown de 2 días (n = 2 a 4) a una dosis de 200 µl por pollo. El día de la primera inmunización se definió como el día 0. Dos semanas después de la primera inmunización, los pollos
65 recibieron una inmunización adicional de manera similar a la primera inmunización, y se mantuvieron durante otras tres semanas. Los pollos inmunizados se sacrificaron por desangrado cardíaco con anestesia. La sangre

anticoagulada con heparina se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos, y el plasma resultante se almacenó a -80 °C. Por separado, se recogió sangre de pollos que no había sido succionada por los ácaros *Dermanyssus gallinae*, y se sometió a tratamiento de anticoagulación con heparina, se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos, y se extrajo el plasma para obtener el componente de células sanguíneas. El componente de células sanguíneas y el plasma que se había preparado a partir de los pollos inmunizados y almacenado se mezclaron para hacer un análisis de sangre.

Además, el abdomen de los pollos de la misma variedad fue despojado de plumas, y se extrajeron trozos de epidermis, se sumergieron en etanol y se almacenaron a 4 °C. Después del almacenamiento, el etanol se reemplazó con PBS, los trozos de epidermis se lavaron tres veces. Luego, se eliminó la grasa subcutánea de los trozos de epidermis, los cuales a continuación se cortaron hasta un tamaño de aproximadamente 2 cm cuadrados para evitar poros grandes, para preparar una lámina de epidermis de pollo.

2) Ensayo de alimentación *in vitro*

Los ácaros *Dermanyssus gallinae* mantenidos en condiciones de inanición en un tubo de 50 ml durante aproximadamente 3 semanas se añadieron a placas de Petri en hielo, y los ácaros activos se transfirieron a papeles de filtro y luego a tubos redondos de 5 ml con un tapón a presión de filtro celular (Falcon) junto con los respectivos papeles de filtro. Se estableció que el número de ácaros *Dermanyssus gallinae* en cada tubo era de 10 a 20 individuos de un total de deutoninfas y adultos. La abertura del tubo redondo se cubrió con la lámina de epidermis de pollo preparada en la sección 1) anterior, sobre la cual se colocó una jeringa truncada de 5 ml.

Se calentaron 2 ml de la muestra de sangre preparada en la sección anterior 1) hasta 37 °C y después se añadieron a la jeringa. El tubo se colocó en una gradilla en un estado ligeramente inclinado, y se dejó reposar en un recipiente de poliestireno espumado. El recipiente de poliestireno espumado se colocó en una incubadora controlada a 37 °C, de modo que la temperatura y la humedad en el recipiente se mantuvieron a 35 °C o más y a un 70 a 90 %, respectivamente. De esta manera, a los ácaros se les permitió succionar la sangre de prueba a través de la lámina de epidermis de pollo.

14 horas después de dejar el tubo en reposo, se descartó la sangre de prueba y solo se extrajo la jeringa. Los ácaros unidos a la lámina de epidermis de pollo se dejaron caer golpeando el fondo del tubo, se separó la lámina de epidermis de pollo y se cubrió el tubo con un tapón a presión del filtro celular. Se contó el número de ácaros cuyo abdomen se había vuelto rojo por la succión de sangre, y luego los ácaros se mantuvieron en el tubo durante otras tres semanas. El número de ácaros muertos por la succión de sangre se determinó en los puntos temporales de las semanas 1 y 3, y la tasa de mortalidad se calculó a partir del número de ácaros muertos por la succión de sangre, respecto al número total de ácaros que habían succionado la sangre. Los resultados se muestran en la Fig. 6.

3) Se realizó una prueba del efecto de las vacunas de manera similar a las secciones 1) y 2) anteriores, excepto que se usaron pollos PNP/DO en lugar de pollos Boris Brown. En esta prueba, el número de ácaros muertos, independientemente de si habían chupado la sangre o no, se determinó diariamente durante un período de 14 días después de terminar la succión de sangre. Además, en el último día del experimento, se añadieron 2 ml de etanol al tubo, se fijaron los ácaros y se contó el número total de ácaros en el tubo en un microscopio estereoscópico. La tasa de mortalidad en los días respectivos se calculó a partir del número de ácaros muertos, respecto al número total de ácaros. Los resultados se muestran en la Fig. 7.

Como se muestra en las Figs. 6 y 7, se reveló que la sangre de los pollos inmunizados con cada una de las proteínas recombinantes tenía una actividad destructora de los ácaros *Dermanyssus gallinae*, y que la sangre de los pollos inmunizados con CatL-2 fue más efectiva para destruir los ácaros *Dermanyssus gallinae* que la de los pollos inmunizados con DgFER2.

Aplicabilidad industrial

Dado que tanto DgCatL-2 como DgFER2 son factores involucrados en la digestión y el almacenamiento de nutrientes en los ácaros rojos y que la inhibición de sus funciones tendría un gran efecto en su crecimiento y propagación, se puede esperar que DgCatL-2, DgFER2 y/o equivalentes inmunológicos de las mismas se pueden aplicar como antígenos candidatos para nuevas vacunas contra los ácaros rojos que no se han descrito hasta ahora.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> National University Corporation Hokkaido University

<120> Método para controlar ácaros rojos y las proteínas usadas en el mismo

<130> P14014WO

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 531

<212> PRT

<213> Dermanyssus gallinae

<400> 1

Val Ser Val Pro Arg Gly Ala Pro Glu Phe Pro Pro Ser Tyr Thr Ala
1 5 10 15

Ser Gly Tyr Ile Leu Leu Pro Tyr Cys Glu Leu Arg Glu Pro Phe Thr
20 25 30

Ala Tyr Tyr Asp Gly Glu Ser Asp Arg Ser Arg Ile Asp Tyr Tyr Asp
35 40 45

Gly Glu Met Lys Thr Phe Val Gly Lys Ser Gly Thr Phe Lys Val Val
50 55 60

Trp Ser Pro Asn Glu Lys Thr His Ile Pro Glu Leu Asn Cys Tyr Glu
65 70 75 80

Ala Gly Pro Ala Lys Ser Gln Ser Ile Leu Pro Asp Leu Thr Asn Phe
85 90 95

Thr Phe Val Arg Val Glu Pro Cys Glu Thr Asp Ser Thr His Ile Val
100 105 110

Lys Pro Leu Leu Arg Gly Ala Asp Lys Cys Tyr Arg Tyr Glu Lys Lys
115 120 125

Val Asp Asn Phe Gly Arg Val Ser Lys Tyr Thr Phe Trp Ala Ser Gln
130 135 140

Asp Asp Asp Asn Thr Pro Ile Pro Val Arg Tyr Val Met Met Gly Tyr
145 150 155 160

Asp Ser Leu Leu Gly Ser His Phe Asp Lys Tyr Glu Val Val Tyr Thr
165 170 175

ES 2 757 373 T3

Asp Tyr Thr Pro Gly Pro Val Glu Asp Asp Leu Phe Gln Val Lys Thr
 180 185 190
 Val Ile Asp Lys Glu Cys Thr Ser Phe Pro Ser Pro Pro Gly Val Ser
 195 200 205
 Thr Thr His Leu Phe Asn Pro Met Ala Glu Phe Ile Asp Glu Lys Asp
 210 215 220
 Ser His Val His Glu His Phe Glu His Phe Lys Ser Thr His Gly Lys
 225 230 235 240
 Ala Tyr Gly His Gln Ala Glu Glu Ile Ile Arg Lys Asp Asn Phe Arg
 245 250 255
 His Asn Gln Arg Phe Val Asn Ser Met Asn Arg Arg Asn Leu Ser Tyr
 260 265 270
 Ala Leu Lys Leu Asn His Arg Ala Asp Trp Ser Gln Asp Glu Phe Arg
 275 280 285
 Leu Leu Arg Gly Arg Leu Gln Phe Thr Ser Gln Lys Ser Met Ala Arg
 290 295 300
 Glu Phe Pro Lys Glu Gln Tyr Ser Asp Arg Val Glu Pro Asp Tyr Val
 305 310 315 320
 Asp Trp Arg Leu Glu Gly Ala Val Thr Pro Val Lys Asp Gln Ala Val
 325 330 335
 Cys Gly Ser Cys Trp Ser Phe Gly Thr Val Gly His Ile Glu Gly Ala
 340 345 350
 Tyr Phe Arg Lys Phe Gly Glu Leu Val Arg Phe Ser Glu Gln Gln Leu
 355 360 365
 Val Asp Cys Ser Trp Asn Ala Gly Asn Asp Ala Cys Asp Gly Gly Leu
 370 375 380
 Asp Phe Ile Ala Tyr His Tyr Ile Gln Lys Tyr Gly Leu Ala Ser Asn
 385 390 395 400
 Asp Gln Tyr Gly Pro Tyr Arg Gly Ile Asp Gly Lys Cys Lys Asp Leu
 405 410 415
 Glu Ile Ser Asn Lys Pro Ile Ser Thr Leu Lys Gly Tyr Arg Asn Val
 420 425 430

ES 2 757 373 T3

Thr Thr Val Glu Asp Leu Arg Lys Ala Leu Ala Phe Val Gly Pro Ile
435 440 445

Ser Val Ser Ile Asp Ala Ser Arg Pro Ser Leu Ser Phe Tyr Ser His
450 455 460

Gly Val Tyr Ser Asp Pro Asp Cys Ser Ser Thr Glu Leu Asp His Ser
465 470 475 480

Val Leu Ala Val Gly Tyr Gly Thr Leu His Gly Glu Pro Tyr Trp Leu
485 490 495

Ile Lys Asn Ser Trp Ser Thr Tyr Trp Gly Asn Asp Gly Tyr Ile Leu
500 505 510

Ile Ser Gln Lys Asp Asn Met Cys Gly Val Ala Ser Gln Ala Thr Tyr
515 520 525

Val Glu Leu
530

<210> 2
<211> 178
<212> PRT
<213> Dermanyssus gallinae

<400> 2

Arg Gln Asp Asn Ala Thr Pro Ser Gly Asn Thr Asn Lys Tyr Val Leu
1 5 10 15

Glu Asp Ser Cys Leu Gly Gly Leu Arg Ala Gln Leu Asn Leu Glu Met
20 25 30

His Ala Ser Leu Leu Tyr Gln Gln Met Ala Ala His Phe Asp Ser Asn
35 40 45

Gln Val Ala His Lys Gly Phe Ala Lys Phe Phe Glu Lys Ser Ser Asp
50 55 60

Glu Glu Arg Glu His Ala Lys Lys Ile Thr Asn Tyr Ile Asn Ala Arg
65 70 75 80

Gly Gly Thr Ile Gly His Leu Asn Val Arg Met Pro Ser Ser Asn Ser
85 90 95

Trp Asp Thr Ala Lys Glu Ala Leu Gln Ala Ala Leu Val Leu Glu His
100 105 110

5

10

ES 2 757 373 T3

His Val Asn Asn Glu Leu His Leu Leu His Arg Thr Ala Asp Glu Asp
115 120 125

Cys Arg Asp Pro Gln Leu Gln Asp Phe Leu Glu Ser Asn Phe Leu Ser
130 135 140

Glu Gln Val Glu Ser Ile Ala Gln Ile Glu Arg Leu Ile Thr Asn Leu
145 150 155 160

Asn Lys Phe Gly Asp Val His Leu Gly Glu Tyr Phe Val Asn Lys Asp
165 170 175

Leu Leu

<210> 3

<211> 1650

<212> ADN

<213> Dermanyssus gallinae

<400> 3

5

atgttgatcc gctgcggttgt cacggctctt gcagccgtga cggttgtctc aggagtttcg	60
gtgccccgag gtgcgccaga gttcccgcgc tcctacactg cgtcgggcta catcctcctg	120
ccgtactgtg agctgcgaga gccgttcacc gcctactacg atggtgaatc ggaccgatcg	180
cgtattgact attacgacgg cgagatgaag acattcgtcg gaaaatcagg cacgtttaag	240
gttgtctggt cgcccaatga gaagacacat ataccggagc tgaactgcta cgaggccgga	300
ccggctaata gccagagcat tttgccggac ctacccaact tcaccttcgt tcgggtcgag	360
ccgtgcgaaa ccgattcgac gcacattgtc aagcccctgc tccgaggtgc tgacaaatgc	420
tatcgctatg agaagaaagt ggataacttc ggacgcgtct ccaagtacac gttctgggcc	480
tcacaggacg acgataaac cccaattccg gtacgctacg tcatgatggg ttacgactca	540
ctcttgggat cgcacttcga caagtatgag gtcgtgtaca ccgactacac acccggaacc	600
gtcgaagatg acctcttcca agtcaagact gttattgaca aggaatgcac ttcgttcccc	660
tcgccgccgg gcgtgtccac taccacctg ttcaaccgga tggcggagtt cattgacgag	720
aaggattcgc acgtgcacga aacttcgag cacttcaa atcgacacacgg caaggcatac	780
ggccaccagg ccgaggagat catccgcaag gacaatttcc gccacaacca acgcttcgtc	840
aattcgatga accgccgcaa cctttcgtac gcgtgaagc tcaaccaccg cgcgactgg	900
agccaggacg agttcaggct gtcgggggc cgtctacagt tcaccagcca gaagtcgatg	960
gccagggagt tccccaaagg acagtactcg gatcgcgctc agccggacta cgtcgactgg	1020
cgactcgagg gagccgtcac gccggtaag gaccaggctg tgtgcgggtc gtgctggagc	1080
tttggcacgg tcggccacat cgaaggcgcc tacttccgca agttcggcga gctggtccgt	1140
ttctccgagc agcagctcgt agactgttcg tggaatgccg gcaacgatgc ctgcgacggt	1200
ggtctggact ttatcgcta ccactacatc cagaagtacg gactggccag caacgaccaa	1260
tacggaccct accgcggcat tgacggcaaa tgcaaggacc tggagatttc caacaagccc	1320
attagcacgc tgaaaggcta ccgaaacgtg accactgtgg aagacctccg caaggcgctc	1380
gcgtttgtcg gcccataatc ggtgtcgatc gatgcatcaa ggccgtcgct cagcttctat	1440
tcgcatggag tctacagcga tccggactgc agttcgacgg aactcgacca ctccgtgctc	1500
gctgttggct acggcacgct gcacggtgag ccgtactggc tcatcaagaa ctcggtggtc	1560
acgtactggg gcaacgacgg atacattctc atctcgcaga aggacaacat gtgcggcggt	1620
gcctcgagg caacctacgt cgagctgtag	1650

<210> 4
 <211> 591
 <212> ADN
 <213> Dermanyssus gallinae

ES 2 757 373 T3

<400> 4

```

atgaaacgtc tcgtctgcat cctcgtaccg ctgctcttcg cagctgtgct cgctcgccaa      60
gataatgccca ccccatcggg caatacgaac aaatacgtgc tcgaggacag ctgtctgggg      120
ggcttgcgag cccagttaaa cctcgagatg cagcctcgc tcctctacca acagatggcc      180
gcacactttg actccaacca ggttgcccac aagggcttcg ctaagttctt cgagaagagt      240
tcggacgagg agcgtgagca cgcgaagaaa atcaccaact acattaacgc acgtggcggc      300
accatcggcc atctcaacgt acggatgccg agctccaact catgggatac ggcaaaagag      360
gcccttcaag ccgccctagt cctcgagcat cagctcaaca acgagttgca ccttctccac      420
agaacggccg acgaggactg tcgtgatccc cagttgcagg acttcttaga gagcaacttc      480
ctcagcgagc aggtggaatc catcgctcag attgagcgtt tgataacgaa cctcaacaag      540
ttcgggtgatg tgcattctcg agaatacttt gtcaacaagg accttctcta g              591

```

5 <210> 5
 <211> 553
 <212> PRT
 <213> Metaseiulus occidentalis

10 <400> 5

```

Met Leu Leu Arg Val Ile Pro Val Val Ala Leu Ala Ile Val Ser Val
1              5              10              15

Ala Gly Gly Pro Ala Asn Pro Arg Asp Ala Pro Val Phe Pro Pro Ala
                20              25              30

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

```


ES 2 757 373 T3

Pro Phe Thr Ala Tyr Tyr Asp Lys Thr Ala Gly Lys Ser Arg Ile Asp
 50 55 60
 Tyr Tyr Gly Gly Glu Met Lys Thr Phe Gln Ile Ala Gly Glu Thr Gly
 65 70 75 80
 Gly Ser Tyr Lys Val Val Trp Ser Pro Asn Asn Glu Thr His Val Pro
 85 90 95
 Glu Gln Asn Cys Tyr Ala Ala Gly Pro Ala Ala Pro Gln Gly Ile Leu
 100 105 110
 Pro Asp Leu Ser Asp Phe Lys Phe Val Arg Thr Glu Ser Cys Phe Thr
 115 120 125
 Asp Thr Ser Thr Leu Leu Asn Thr Leu Leu Ser Asn Ala Ala Lys Cys
 130 135 140
 Tyr Arg Tyr Glu Asn Thr Val Gln Lys Tyr Asp Arg Val Ser Lys Tyr
 145 150 155 160
 Val Phe Trp Ala Asn Gln Asp Gly Asp Asn Asn Val Ile Pro Val Arg
 165 170 175
 Tyr Met Met Met Gly Tyr Asp Ser Leu Leu Gly Ser His Phe Asp Lys
 180 185 190
 Tyr Glu Val Ile Tyr Asp Asp Tyr Thr Pro Gly Pro Val Asp Gly Asp
 195 200 205
 Val Phe Asp Val Thr Ser Val Ile Asp Lys Pro Cys Thr Asp Phe Pro
 210 215 220
 Ser Pro Pro Gly Gln Ser Val Ser His Leu Phe Asn Pro Met Lys Glu
 225 230 235 240
 Phe Val His His Asp Asp Ser His Val Asp Glu His Phe Ser Asn Phe
 245 250 255
 Lys Asn Glu His Gly Lys Ser Tyr Glu His Pro Thr Glu Glu Arg Glu
 260 265 270
 Arg Arg His Asn Phe His His Asn Met Arg Phe Val Asn Ser Met Asn
 275 280 285
 Arg Arg Asn Leu Ser Phe Ala Leu Lys Leu Asn Asn Arg Ala Asp Trp

ES 2 757 373 T3

290	295	300
Asn Gln Gly Glu Phe Lys Leu Leu Arg Gly Arg Leu Gln Ser Thr Asn 305 310 315 320		
Val Lys Ser Ser Ala Glu Asp Phe Pro Lys Glu Lys Phe Glu His Arg 325 330 335		
Thr Val Pro Asp Tyr Val Asp Trp Arg Leu Glu Gly Ala Val Thr Pro 340 345 350		
Val Lys Asp Gln Ala Ile Cys Gly Ser Cys Trp Ser Phe Gly Thr Val 355 360 365		
Gly His Ile Glu Gly Gln Tyr Phe Leu Lys His Gly Glu Leu Val Arg 370 375 380		
Phe Ala Glu Gln Gln Leu Val Asp Cys Ser Trp Thr Ser Gly Asn Asp 385 390 395 400		
Ala Cys Asp Gly Gly Leu Asp Tyr Val Ala Tyr Asp Tyr Ile Lys Lys 405 410 415		
Tyr Gly Leu Ser Ser Asp Ala Gln Tyr Gly Pro Tyr Arg Gly Ile Asp 420 425 430		
Gly Lys Cys Lys Asp Val Glu Ile Glu Asn Lys Pro Ile Thr Thr Ile 435 440 445		
Gln Arg Tyr Tyr Asn Ile Ser Gly Val Glu Asn Leu Arg Lys Ala Ile 450 455 460		
Ala Phe Val Gly Pro Ile Ser Val Ala Ile Asp Ala Ser Arg Pro Ser 465 470 475 480		
Leu Ser Phe Tyr Ala His Gly Val Tyr Glu Asp Pro Asp Cys Ser Ser 485 490 495		
Thr Glu Leu Asp His Ala Val Leu Ala Val Gly Tyr Gly Val Leu His 500 505 510		
Gly Lys Pro Tyr Trp Leu Ile Lys Asn Ser Trp Ser Thr Tyr Trp Gly 515 520 525		
Asn Asp Gly Tyr Ile Leu Ile Ser Gln Lys Asp Asn Met Cys Gly Val 530 535 540		

ES 2 757 373 T3

Ala Ser Thr Pro Thr Tyr Val Glu Leu
545 550

<210> 6
<211> 564
<212> PRT
<213> Ixodes scapularis
<400> 6

5

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

Gly Gln Glu Arg Pro Glu Trp Gly Asp Val Tyr Lys Val Lys Gly Val
20 25 30

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

Asp Ala Ser Gln Asn Leu Ser Arg Ile Asp Tyr Tyr Arg Gly Met Val
50 55 60

Gln Thr Ile Gln Val Ala Pro Asp Ala Glu Glu Gly Arg Ser Glu Thr
65 70 75 80

Pro Tyr Gly Ala Asn Tyr Lys Ile Ala Tyr Met Pro Asp Lys Glu Thr
85 90 95

Trp Gln Pro Arg Arg Thr Cys Phe Leu Val Asn Gly Thr Ala Asn Asn
100 105 110

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

Val Arg Gln Glu Ser Cys Trp Glu Gly Thr Thr Ala Val Asp Glu Pro
130 135 140

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

Asn Arg Val Ser Lys Tyr Thr Leu Trp Val Ser Arg Asp Gly Gln Gly
165 170 175

Arg Ala Val Pro Arg Arg Tyr Leu Met Met Gly Tyr Asn Thr Leu Leu
180 185 190

Gly Ser His Phe Asp Lys Tyr Glu Leu Ile Tyr His Gly Phe Ser Arg
195 200 205

10

ES 2 757 373 T3

Lys Pro Leu Pro Ser Ser Val Phe Asp Ile Thr His Leu Ile Asn Glu
 210 215 220
 Thr Cys Arg Arg Phe Pro Gly Pro Gly Ala Glu His Leu Ala Leu His
 225 230 235 240
 Ser Pro Met Ala Glu Phe Met Asn Gly His Asp Ala His Met His Ser
 245 250 255
 Ala Phe Asp Lys Phe Arg Glu Asp His Ser Arg Asp Tyr Gly His His
 260 265 270
 Thr Glu His Glu Arg Arg Arg Asp Ile Phe Arg Gln Asn Leu Arg Phe
 275 280 285
 Ile His Ser Thr Asn Arg Ala Asn Arg Gly Tyr Thr Val Lys Val Asn
 290 295 300
 His Leu Ala Asp Arg Ser Ser Asp Glu Leu Gly Tyr Leu Arg Gly Arg
 305 310 315 320
 Leu Gln Ser Arg Ala Pro Thr Asn Ala Leu Pro Phe Pro Lys Asp Arg
 325 330 335
 Phe Ser Ser Asp Leu Pro Asp Tyr Val Asp Trp Arg Leu Tyr Gly Ala
 340 345 350
 Val Thr Pro Val Lys Asp Gln Ala Val Cys Gly Ser Cys Trp Ser Phe
 355 360 365
 Gly Thr Val Gly Glu Leu Glu Ala Ala Leu Phe Arg Lys Ala Arg Arg
 370 375 380
 Phe Ser Met Phe Thr Gly Lys Leu Thr Arg Leu Ser Glu Gln Gln Leu
 385 390 395 400
 Val Asp Cys Ser Trp Asn Gln Gly Asn Asn Gly Cys Asp Gly Gly Glu
 405 410 415
 Asp Phe Arg Ala Tyr Glu Tyr Ile Arg Ala His Gly Leu Ala Thr Asp
 420 425 430
 Glu Asp Tyr Gly Ala Tyr Leu Gly Gln Asp Gly Ile Cys His Asp Thr
 435 440 445
 Lys Val Asn Ala Thr Val Thr Thr Ile Lys Asn Tyr Ile Asn Val Thr
 450 455 460

ES 2 757 373 T3

Asp Lys Glu Ser Leu Gln Lys Ala Leu Ala Asn Val Gly Pro Val Ser
465 470 475 480

Val Ser Ile Asp Ala Ala Val Lys Ala Phe Thr Phe Tyr Ser Asn Gly
485 490 495

Val Phe Tyr Asp Pro Lys Cys Arg Asn Asp Thr Asp Gly Leu Asp His
500 505 510

Ala Val Leu Ala Val Gly Tyr Gly Thr Leu Gln Gly Glu Pro Tyr Trp
515 520 525

Leu Ile Lys Asn Ser Trp Ser Thr Tyr Trp Gly Asn Asp Gly Tyr Val
530 535 540

Leu Ile Ser Gln Lys Asp Asn Asn Cys Gly Val Ala Ser Gln Gly Thr
545 550 555 560

Tyr Val Glu Leu

<210> 7

<211> 564

<212> PRT

<213> Rhipicephalus appendiculatus

<400> 7

Met Met Arg His Ala Cys Ile Val Leu Leu Leu Ser Ile Ala Gly Cys
1 5 10 15

Leu Ala Gln Asp Leu Pro Asp Trp Gly Ser Phe Tyr Lys Val Lys Gly
20 25 30

Val Leu Tyr Leu Pro Tyr Ala Glu Ile Arg Glu Pro Phe Thr Gly Tyr
35 40 45

Tyr Asp Ala Thr Gln Asn Thr Ser Arg Ile Asp Tyr Tyr Asp Gly Met
50 55 60

Val Gln Thr Val Gln Leu Ser Pro Ser Ala Pro Ile Gly Gly Arg Arg
65 70 75 80

Ile Pro Leu Trp His Gln Leu Gln Asp Cys Ile His Ala Arg Pro Lys
85 90 95

Asp Met Gly Val Gln Ser Ala Pro Ala Ser Gln Val Asn Gly Thr Glu
100 105 110

5

10

ES 2 757 373 T3

Asn	Ala	His	Leu	Phe	Pro	Leu	Gln	Asp	Val	Leu	Pro	Lys	Cys	Cys	Gly	115	120	125
Phe	Thr	Phe	Val	Arg	Arg	Glu	Ser	Cys	Trp	Phe	Gly	Asn	Asp	Asp	Ala	130	135	140
Val	Ala	His	Gln	Gly	Lys	Arg	His	Cys	Glu	Arg	Phe	Gln	Leu	Thr	Val	145	150	155
Pro	Thr	Arg	Asp	Arg	Val	Ser	Lys	Tyr	Thr	Leu	Trp	Val	Ser	Arg	Asp	165	170	175
Ser	Gln	Gly	Arg	Ala	Val	Pro	Arg	Arg	Tyr	Leu	Met	Arg	Gly	Tyr	Asn	180	185	190
Thr	Leu	Leu	Gly	Ser	His	Phe	Asp	Lys	Tyr	Glu	Val	Leu	Tyr	Tyr	Gly	195	200	205
Tyr	Ser	Arg	Asp	Pro	Val	Pro	Pro	Ser	Val	Phe	Asp	Val	Thr	Thr	Leu	210	215	220
Phe	Asn	Gly	Thr	Cys	Arg	Ser	Phe	Pro	Gly	Pro	Gly	Ala	Glu	Arg	Leu	225	230	235
Ala	Leu	His	Asn	Pro	Met	Ala	Glu	Phe	Leu	Gly	Asn	His	Asp	Gly	His	245	250	255
Thr	Lys	His	Ser	Phe	Glu	Asp	Phe	Lys	Glu	Thr	His	Lys	Arg	Thr	Tyr	260	265	270
Glu	Leu	Asp	Thr	Glu	His	Asp	Arg	Arg	Arg	Asp	Ile	Phe	Arg	Gln	Asn	275	280	285
Leu	Arg	Phe	Ile	Asp	Ser	Lys	Asn	Arg	Ala	Asn	Leu	Gly	Tyr	Asn	Leu	290	295	300
Ala	Val	Asn	His	Leu	Ala	Asp	Arg	Thr	Arg	Glu	Glu	Ile	Ser	Val	Leu	305	310	315
Arg	Gly	Arg	Leu	Gln	Ser	Lys	Asp	Gly	Ser	Ser	Arg	Ala	Glu	Pro	Phe	325	330	335
Pro	Arg	His	Arg	Phe	Thr	Ala	Lys	Leu	Pro	Asp	Gln	Ile	Asp	Trp	Arg	340	345	350
Pro	Tyr	Gly	Ala	Val	Thr	Pro	Val	Lys	Asp	Gln	Ala	Val	Cys	Gly	Ser	355	360	365

ES 2 757 373 T3

Cys Trp Ser Phe Gly Thr Val Gly Glu Leu Glu Gly Ala Tyr Phe Arg
370 375 380

Lys Thr Gly Arg Leu Val Arg Leu Ser Glu Gln Gln Leu Val Asp Cys
385 390 395 400

Ser Trp Asn Asn Gly Asn Asn Gly Cys Asp Gly Gly Glu Asp Phe Arg
405 410 415

Ala Tyr Glu Tyr Ile Ala Asp His Gly Leu Ala Ser Asp Glu Asp Tyr
420 425 430

Gly Ala Tyr Ile Gly Gln Asp Gly Val Cys His Asp Ser Lys Val Asn
435 440 445

Ser Thr Ile Ser Ser Ile Lys Ser Tyr Val Asn Ile Thr Asn Arg Asp
450 455 460

Asp Leu Pro Thr Ala Leu Ala Asn Val Gly Pro Val Ser Val Ser Ile
465 470 475 480

Asp Ala Ala Leu Arg Ser Phe Ser Phe Tyr Pro Thr Val Ser Ser Met
485 490 495

Ile Pro Thr Ala Ala Met Asp Thr Asp Ser Leu Asp His Ser Val Leu
500 505 510

Arg Gln Ser Ala Thr Arg Thr Leu Gln Gly Glu Pro Tyr Trp Gly Val
515 520 525

Lys Asn Ser Trp Val Tyr Leu Leu Gly Glu Met Met Gly Tyr Val Leu
530 535 540

Ile Ser Pro Lys Gly Thr Thr Thr Gly Gly Val Ala Thr Gln Gly Thr
545 550 555 560

Tyr Val Glu Leu

<210> 8
<211> 194
<212> PRT
<213> Metaseiulus occidentalis

<400> 8

Met Asn Arg Leu Leu Tyr Ile Val Pro Leu Leu Phe Ala Val Val Ser
1 5 10 15

ES 2 757 373 T3

Ala Arg Leu Asp Asn Asp Val Pro Ser Glu Ser Ser Asn Lys Tyr His
20 25 30

Leu His Glu Thr Cys Arg Val Ala Leu Gln Asn Gln Ile Asp Arg Glu
35 40 45

Leu His Ala Ser Leu Val Tyr Gln Gln Met Ala Ala His Phe Glu Asn
50 55 60

Asn Lys Val Ala Arg Lys Gly Phe Ala Lys Phe Phe Met Asp Asn Ser
65 70 75 80

Asn Glu Glu Arg Asp His Ala Gln Lys Leu Ile Ser Tyr Ile Asn Ser
85 90 95

Arg Gly Gly Thr Ile Ala Ala Phe Arg Val Ser Met Pro Lys Asp Thr
100 105 110

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

Ile Glu Val Asn Asn Ala Leu His Glu Val His Gly Lys Ala Glu Arg
130 135 140

Asp Cys Thr Asp Pro Gln Leu Gln Asp Phe Leu Glu Ala Asn Phe Leu
145 150 155 160

Asn Glu Gln Val Glu Ser Ile Asp Asn Ile His Arg Leu Leu Ala Thr
165 170 175

Leu Asn Gly Met Asp Gln Gly Leu Gly Glu Tyr Leu Val Asn Lys Asp
180 185 190

Leu Gln

<210> 9
<211> 196
<212> PRT
<213> Ixodes ricinus

<400> 9

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

Gly Asn Asn Leu Phe Glu Asn Leu Asp Lys Tyr Pro Leu Gln Asp Glu
20 25 30

ES 2 757 373 T3

Cys Gln Ala Ala Leu Gln Glu His Ile Asn Val Glu Met His Ala Ser
35 40 45

Leu Val Tyr Met Gln Met Ala Ala His Phe Asp Asn Asn Lys Val Ala
50 55 60

Arg Lys Gly Phe Ser Thr Phe Phe Ala Glu Asn Ser Lys Glu Glu Arg
65 70 75 80

Glu His Ala Gln Lys Ile Ile Asp Tyr Ile Asn Lys Arg Gly Ser Thr
85 90 95

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

Val Leu Gln Ala Leu Arg Asp Ala Ile Ser Leu Glu Asn Lys Val Thr
115 120 125

Asn Lys Leu His Ala Val His Lys Ile Ala Asp Glu Glu Cys Lys Asp
130 135 140

Pro Gln Leu Met Asp Phe Ile Glu Ser Glu Phe Leu Glu Glu Gln Val
145 150 155 160

Asn Ser Ile Asp Lys Leu Gln Arg Met Ile Thr Val Leu Ser Asn Met
165 170 175

Asp Ser Gly Thr Gly Glu Tyr Leu Leu Asp Arg Glu Leu Leu Gly Asp
180 185 190

Lys Lys Glu Phe
195

<210> 10
<211> 196
<212> PRT
<213> Ixides persulcatus

<400> 10

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

Gly Asn Asn Leu Phe Glu Asn Leu Asp Lys Tyr Pro Leu Gln Asp Glu
20 25 30

Cys Gln Ala Ala Leu Gln Glu His Ile Asn Val Glu Met His Ala Ser
35 40 45

5

10

ES 2 757 373 T3

Leu Val Tyr Met Gln Met Ala Ala His Phe Asp Asn Asn Lys Val Ala
50 55 60

Arg Lys Gly Phe Ser Thr Phe Phe Ala Glu Asn Ser Lys Glu Glu Arg
65 70 75 80

Glu His Ala Gln Lys Ile Ile Asp Tyr Ile Asn Lys Arg Gly Ser Thr
85 90 95

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

Val Leu Gln Ala Leu Arg Asp Ala Ile Ser Leu Glu Asn Lys Val Thr
115 120 125

Asn Lys Leu His Ala Val His Lys Ile Ala Asp Glu Glu Cys Lys Asp
130 135 140

Pro Gln Leu Met Asp Phe Ile Glu Ser Glu Phe Leu Glu Glu Gln Val
145 150 155 160

Asn Ser Ile Asp Lys Leu Gln Arg Met Ile Thr Val Leu Ser Asn Met
165 170 175

Asp Ser Gly Thr Gly Glu Tyr Leu Leu Asp Arg Glu Leu Leu Gly Asp
180 185 190

Lys Lys Glu Phe
195

<210> 11

<211> 199

5 <212> PRT

<213> Heamaphysalis longicornis

<400> 11

Met Leu Pro Ile Leu Ile Phe Ala Phe Ala Leu Leu Cys Val Ala Ser
1 5 10 15

Ala Gly Asn Asn Leu Asn Glu Gln Val Asn Gln Asn Lys Tyr Phe Leu
20 25 30

His Asp Arg Cys Arg Leu Gly Leu Gln Glu Gln Ile Asn Ala Glu Leu
35 40 45

His Ala Ser Leu Val Tyr Met Gln Met Ala Ala Tyr Leu Gly Asn Asn
50 55 60

10

ES 2 757 373 T3

Lys Val Ala Arg Ala Gly Phe Ala Arg Phe Phe Ser Asp Gln Ser Ser
 65 70 75 80
 Glu Glu Arg Glu His Ala Gln Lys Leu Val Asp Tyr Val Asn Leu Arg
 85 90 95
 Gly Gly Thr Val Ser Asn Val Asn Val Asp Met Pro Ala Thr Ala Thr
 100 105 110
 Trp Met Ser Val Leu Asp Thr Leu Gln Ala Ala Leu Ala Leu Glu His
 115 120 125
 Gln Val Thr Asn Arg Leu His Gly Leu His Ala Leu Ala Ala Asp His
 130 135 140
 Cys Arg Asp Pro Gln Met Thr Asp Phe Leu Glu Gln Glu Phe Leu Ala
 145 150 155 160
 Glu Gln Met His Ser Ile Asp Lys Leu Gln Arg Leu Ile Thr Gln Leu
 165 170 175
 Gln Asn Met Asp Thr Gly Leu Gly Glu Phe Leu Leu Asp Arg Glu Leu
 180 185 190
 Arg Arg Glu Asp Ser Asp Lys
 195

5 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 12
 tggcctctg ggatcagctc g 21

15 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 13
 aatatcgctt cggtcgcg c 21

25 <210> 14
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> misc_feature

	<222> (6)..(6)	
	<223> d representa A, G o T	
5	<220> <221> misc_feature <222> (7)..(7) <223> w representa A o T	
10	<220> <221> misc_feature <222> (8)..(9) <223> s representa C o G	
15	<220> <221> misc_feature <222> (12)..(12) <223> s representa C o G	
20	<220> <221> misc_feature <222> (10)..(10) <223> y representa C o T	
25	<220> <221> misc_feature <222> (18)..(18) <223> y representa C o T	
30	<220> <221> misc_feature <222> (25)..(25) <223> h representa A, C o T	
35	<220> <221> misc_feature <222> (19)..(19) <223> m representa A o C	
40	<220> <221> misc_feature <222> (21)..(21) <223> r representa A o G	
45	<220> <221> misc_feature <222> (24)..(24) <223> r representa A o G	
50	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 14 cacgcdwssy tsghaymw rcaratggc	29
55	<210> 15 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <221> misc_feature <222> (2)..(3) <223> r representa A o G	
65	<220> <221> misc_feature	

	<222> (6)..(6)		
	<223> s representa C o G		
5	<220> <221> misc_feature <222> (8)..(8) <223> y representa C o T		
10	<220> <221> misc_feature <222> (9)..(9) <223> s representa C o G		
15	<220> <221> misc_feature <222> (10)..(11) <223> b representa C, G o T		
20	<220> <221> misc_feature <222> (15)..(15) <223> v representa A, C o G		
25	<220> <221> misc_feature <222> (17)..(17) <223> d representa A, G o T		
30	<220> <221> misc_feature <222> (21)..(21) <223> r representa A o G		
35	<220> <223> Cebador de PCR		
	<400> 15 arraastysb bctcvadgaa rtcc	24	
40	<210> 16 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> Cebador de PCR		
50	<400> 16 gtcaacacga acgcagcagc a	21	
55	<210> 17 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Cebador de PCR		
60	<400> 17 atctgcgcgcgcat ccagcgtcgt g	21	
65	<210> 18 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		

	<220> <223> Cebador de PCR	
5	<400> 18 tattggtgct acaacaccgg c	21
10	<210> 19 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador de PCR	
15	<400> 19 gctggacagt attgtgacta t	21
20	<210> 20 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador de PCR	
25	<400> 20 atgttgatcc gctgcgttgt c	21
30	<210> 21 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador de PCR	
35	<400> 21 ctacagctcg acgtaggttg c	21
40	<210> 22 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador de PCR	
50	<400> 22 gtctggactt tatcgctac c	21
55	<210> 23 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador de PCR	
60	<400> 23 ttcgttagcc ttacagcgtg c	21
65	<210> 24 <211> 18 <212> PRT <213> Dermanyssus gallinae	

ES 2 757 373 T3

<400> 24

Met Leu Ile Arg Cys Val Val Thr Ala Leu Ala Ala Val Thr Val Val
1 5 10 15

Ser Gly

5 <210> 25
<211> 18
<212> PRT
<213> Dermanyssus gallinae

10 <400> 25

Met Lys Arg Leu Val Cys Ile Leu Val Pro Leu Leu Phe Ala Ala Val
1 5 10 15

Leu Ala

REIVINDICACIONES

1. Una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1, una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2, y/o un equivalente inmunológico de la misma, para su uso en la provocación de una respuesta inmunitaria específica de los ácaros rojos en un animal doméstico, en la que el equivalente inmunológico se selecciona de un grupo que consiste en los (b) a (j) descritos a continuación y que es capaz de provocar la respuesta inmunitaria específica de *Dermanyssus gallinae*;
- (b) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se eliminan o sustituyen de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1 y que tiene una identidad de al menos 80 % o más con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1,
- (c) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se insertan de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1 y que tiene una identidad de al menos 80 % o más con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1,
- (f) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se eliminan o sustituyen de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2 y que tiene una identidad de al menos 80 % o más con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2,
- (g) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se insertan de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2 y que tiene una identidad de al menos 80 % o más con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2,
- (i) un fragmento polipeptídico de las proteínas que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2, o las proteínas de los (b) a (g) anteriores, en el que el fragmento polipeptídico tiene no menos de 30 restos de aminoácidos, y
- (j) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se añaden uno o más aminoácidos opcionales en el extremo N y/o C de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2, o cualquiera de las secuencias de aminoácidos definidas en los (b) a (i) anteriores.
2. Una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de a) a d) descritos a continuación, o un fragmento polipeptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos parcial de la secuencia de aminoácidos de a) a c) descritos a continuación, en la que la proteína o el fragmento polipeptídico es capaz de provocar una respuesta inmunitaria específica de *Dermanyssus gallinae* y el fragmento polipeptídico tiene no menos de 30 restos de aminoácidos:
 - a) la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1,
 - b) una secuencia de aminoácidos en la cual se eliminan o sustituyen de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1 y que tiene una identidad de al menos 80 % o más con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1,
 - c) una secuencia de aminoácidos en la cual se insertan de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1 y que tiene una identidad de al menos 80 % o más con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1,
 - d) una secuencia de aminoácidos en la cual se añaden uno o más aminoácidos opcionales en el extremo N y/o C de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de a) a c) o una secuencia de aminoácidos parcial de la misma.
3. Una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de e) a h) descritos a continuación, o un fragmento polipeptídico que consiste en una secuencia de aminoácidos parcial de la secuencia de aminoácidos de e) a g) descritos a continuación, en la que la proteína o el fragmento polipeptídico es capaz de provocar una respuesta inmunitaria específica de *Dermanyssus gallinae* y el fragmento polipeptídico tiene no menos de 30 restos de aminoácidos:
 - e) la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2,
 - f) una secuencia de aminoácidos en la cual se eliminan o sustituyen de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2 y que tiene una identidad de al menos 80 % o más con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2,
 - g) una secuencia de aminoácidos en la cual se insertan de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2 y que tiene una identidad de al menos 80 % o más con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2,
 - h) una secuencia de aminoácidos en la cual se añaden uno o más aminoácidos opcionales en el extremo N y/o C de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de e) a g) o una secuencia de aminoácidos parcial de la misma.
4. Un ácido nucleico que codifica la proteína o el fragmento polipeptídico de la misma como se define en la reivindicación 2 o la reivindicación 3.
5. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Una vacuna para su uso en la provocación de una respuesta inmunitaria específica de los ácaros rojos en un animal doméstico, que comprende la proteína o el fragmento polipeptídico como se define en la reivindicación 2 y/o la

reivindicación 3 o el ácido nucleico como se define en la reivindicación 4 y/o el vector de expresión como se define en la reivindicación 5.

- 5 7. Proteínas seleccionadas del grupo que consiste en una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1, una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2, y/o equivalentes inmunológicos de la misma, para su uso en la provocación de una respuesta inmunitaria específica de los ácaros rojos en un animal doméstico, en la que el equivalente inmunológico se selecciona de un grupo que consiste en los (b) a (j) descritos a continuación y que es capaz de provocar la respuesta inmunitaria específica de *Dermanyssus gallinae*;
- 10 (b) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se eliminan o sustituyen de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1 y que tiene una identidad de al menos 80 % o más con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1,
- 15 (c) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se insertan de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1 y que tiene una identidad de al menos 80 % o más con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1,
- (f) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se eliminan o sustituyen de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2 y que tiene una identidad de al menos 80 % o más con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2,
- 20 (g) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se insertan de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2 y que tiene una identidad de al menos 80 % o más con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 2,
- (i) un fragmento polipeptídico de las proteínas que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2, o las proteínas de los (b) a (g) anteriores, en el que el fragmento polipeptídico tiene no
- 25 menos de 30 restos de aminoácidos, y
- (j) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en la cual se añaden uno o más aminoácidos opcionales en el extremo N y/o C de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2, o cualquiera de las secuencias de aminoácidos definidas en los (b) a (i) anteriores.

FIG. 1

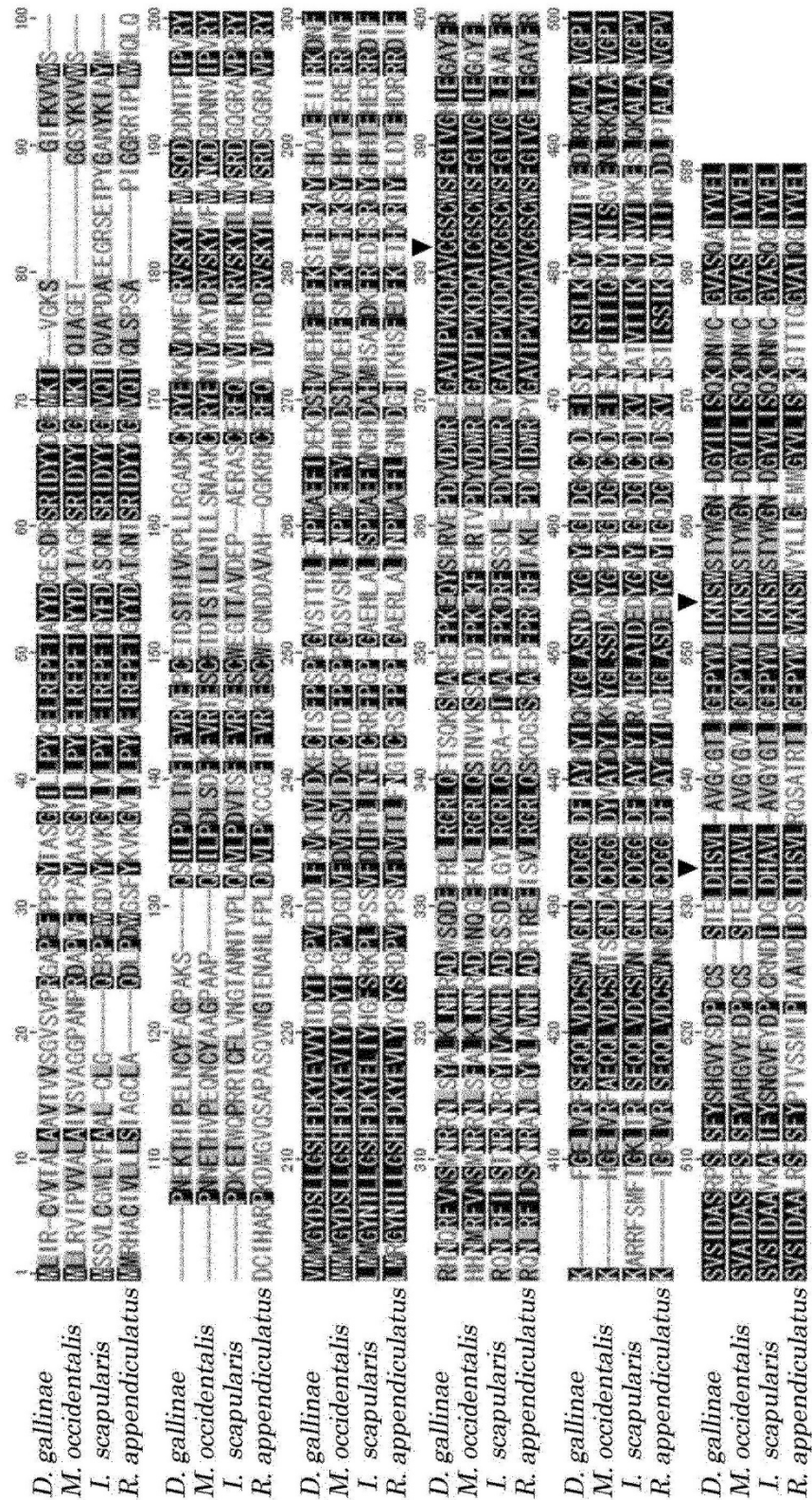


FIG. 2

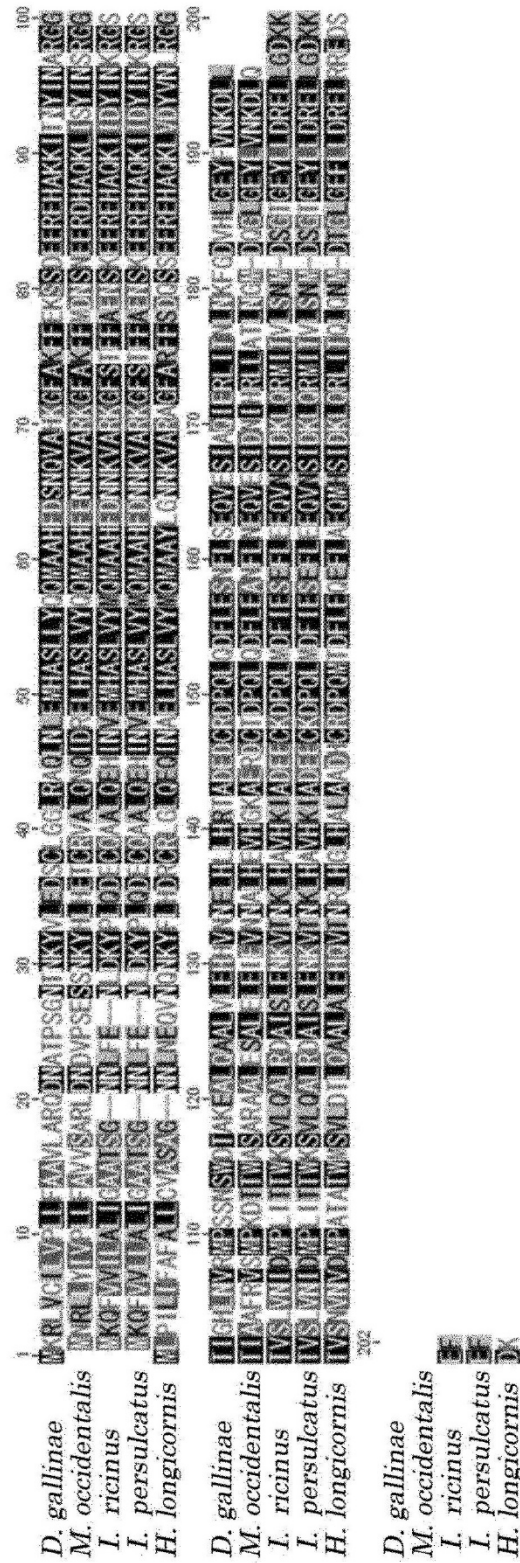


FIG. 3

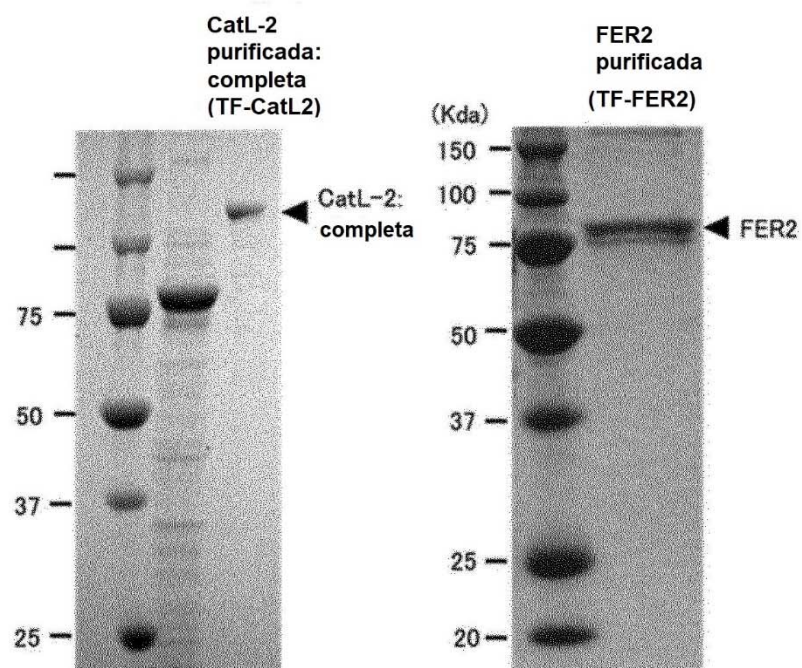


FIG. 4

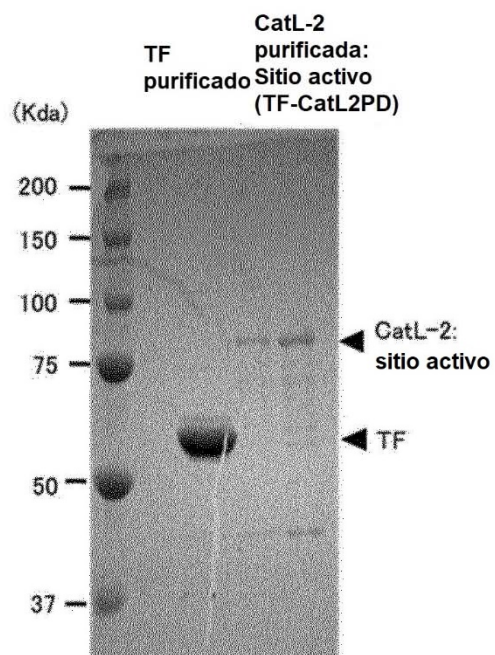


FIG. 5

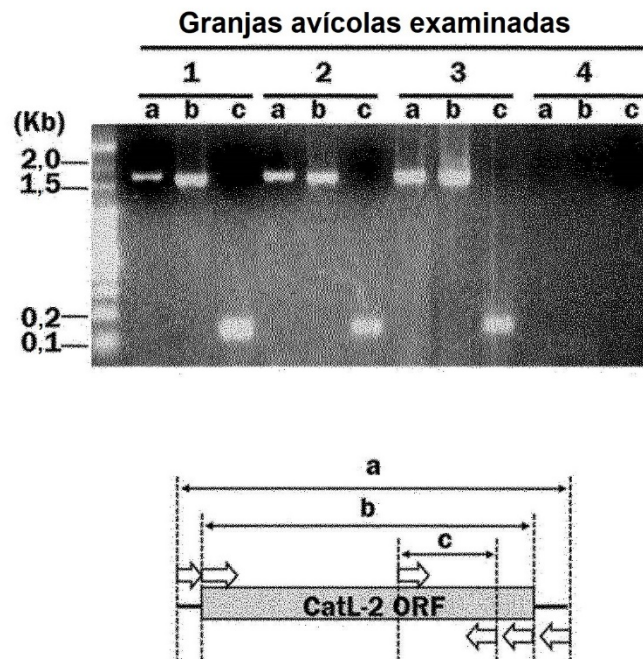


FIG. 6

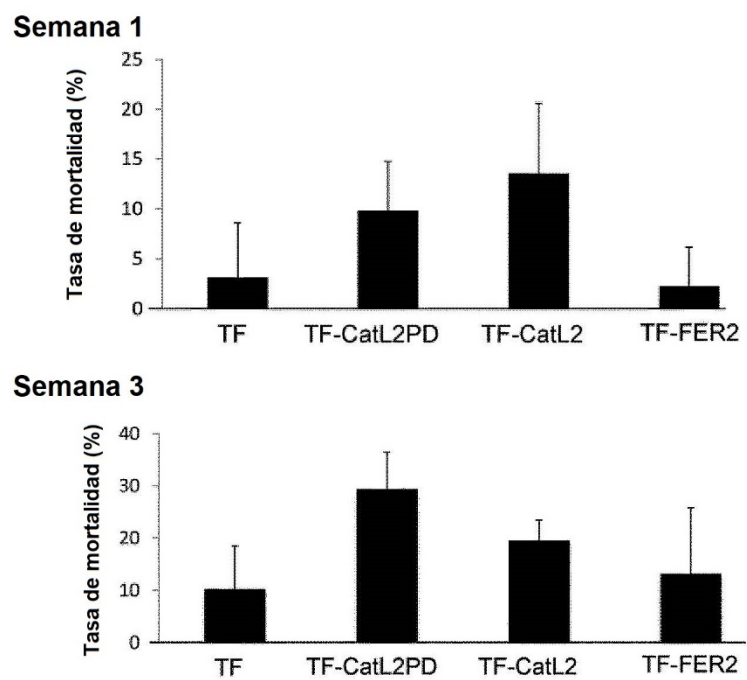


FIG. 7

