

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 379**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2017 PCT/EP2017/051492**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.08.2017 WO17133938**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2017 E 17703670 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3411395**

54 Título: **Receptor nicotínico de acetilcolina de *Rhipicephalus* y plaguicida que actúa sobre el mismo**

30 Prioridad:

01.02.2016 EP 16153550

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

26.11.2020

73 Titular/es:

**BAYER ANIMAL HEALTH GMBH (100.0%)
Kaiser-Wilhelm-Allee 10
51373 Leverkusen, DE**

72 Inventor/es:

**TURBERG, ANDREAS;
AKKÖSE, MELANIA;
PUINEAN, MIRAL y
WILLIAMSON, MARTIN**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 796 379 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

Receptor nicotínico de acetilcolina de *Rhipicephalus* y plaguicida que actúa sobre el mismo

Referencia a un listado de secuencias

El presente documento incluye un listado de secuencias.

5 **Campo de la invención**

Se desvela una subunidad del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR, siglas del inglés *nicotinic acetylcholine receptor*) de garrapatas de *Rhipicephalus*. También se desvela un procedimiento de identificación de un compuesto capaz de modular la actividad de dicha subunidad del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) de garrapatas de *Rhipicephalus*.

10 **Antecedentes**

El siguiente análisis de los antecedentes, se proporciona simplemente para ayudar al lector a comprender la invención y no se admite que describa o constituya un estado de la técnica anterior a la presente invención.

Desde el punto de vista económico, médico y veterinario, una gran cantidad de garrapatas del género *Rhipicephalus* son importantes porque son vectores de organismos patógenos. Las enfermedades transmitidas por garrapatas de este género incluyen fiebre de la costa este, anaplasmosis, babesiosis, rickettsiosis, fiebre botonosa, enfermedad de Lyme, fiebre Q, fiebre maculosa de las Montañas Rocosas y fiebre hemorrágica de Crimea-Congo. Aunque la mayor parte de los miembros del género *Rhipicephalus* son nativos de África tropical, algunas garrapatas, como la garrapata canina marrón (*Rhipicephalus sanguineus*), también denominada garrapata de las perreras o garrapata canina pantropical, y *Rhipicephalus bursa*, también se encuentran en el sur de Europa.

20 Un miembro importante del género *Rhipicephalus* es *Rhipicephalus microplus* (anteriormente *Boophilus microplus*), que se considera que es la garrapata más importante del ganado a nivel mundial. *Rhipicephalus microplus* puede encontrarse en una variedad de hospedadores tales como ganado bovino, búfalo, caballo, burro, cabra, oveja, ciervo, cerdo, perro, así como en algunos animales salvajes. La garrapata afecta particularmente al ganado bovino en las regiones tropicales y subtropicales. Las infestaciones pesadas en los animales pueden disminuir la productividad y dañar las pieles. *R. microplus* también puede transmitir babesiosis o "fiebre del ganado bovino" (causada por *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*) y anaplasmosis (causada por *Anaplasma marginale*). Otro vector de babesiosis es *Rhipicephalus annulatus*.

30 Ambas especies, *R. microplus* y *R. annulatus*, fueron básicamente erradicadas de los Estados Unidos en 1943, sin embargo, existen en México y, a pesar de una zona de cuarentena permanente a lo largo de la frontera mexicana, son frecuentes brotes en la frontera mexicana. *R. microplus* también ha planteado un problema importante para la industria ganadera en el norte de Australia durante casi 100 años. En la actualidad, las garrapatas se limitan a una zona del norte y este de Australia a través del movimiento controlado del ganado bovino y por las condiciones climáticas que limitan su propagación.

35 En América Central y del Sur, cerca de 175 millones de bovinos están expuestos a *R. microplus*, lo que corresponde a aproximadamente un 70 % del ganado bovino criado en esta región. Como ejemplo adicional, *R. microplus* es una de las garrapatas más importantes que infestan a animales que producen productos de lácteos de la India, particularmente de la región de Punjab. Se sugirió que *R. microplus* se introdujo en el Este y en Sudáfrica desde Madagascar, donde originalmente había llegado con ganado bovino del sur de Asia. En Sudáfrica, *R. microplus* se ha establecido ahora, entre otras, en zonas a lo largo de las costas sur y este de las provincias del Cabo occidental y oriental, y también está presente en las regiones costeras de Mozambique, Tanzania y Kenia. La garrapata también se encuentra en partes de las provincias orientales y centrales de Zambia, en todo Malawi y al este y norte del lago Malawi en Tanzania. *R. microplus* también se encuentra en África occidental, principalmente en Costa de Marfil, Benin, Burkina Faso y Mali. Existen serias preocupaciones de que esta garrapata podría extenderse a toda la región de África occidental.

45 La garrapata del ganado bovino más común y extendida en África es *Rhipicephalus decoloratus*, la garrapata azul africana. Similar a *R. microplus*, el ganado bovino es el principal hospedador de esta garrapata, pero también se alimenta en caballos, burros, ovejas, cabras y los sitios de alimentación preferidos de todas las fases en el ganado bovino son, el lomo, las extremidades superiores, el cuello, los hombros, la papada y el vientre. La garrapata es, hasta cierto punto, responsable de la transmisión de la babesiosis, anaplasmosis (causada por *Anaplasma marginale*) y teileriosis (causada por *Borrelia theileri*) en el ganado bovino, en ovejas, cabras y caballos en África occidental, África del este y África del sur. Los elands pueden ser portadores asintomáticos de *A. marginale* y por tanto podrían servir como un reservorio de infección para el ganado bovino doméstico. Se sospecha que *R. decoloratus* es también un vector de *Babesia traubmanni*, causante de la babesiosis porcina.

55 Aparte de las enfermedades que transmiten, tanto *R. decoloratus* como *R. microplus* pueden tener un impacto significativo en la producción ganadera. Algunos de los efectos más relevantes incluyen irritación, pérdida de peso y

daños en el cuero. Comparando vacas Holstein-Friesian de media lactancia infestadas con *R. microplus* durante 15 semanas, y vacas de control no infestadas, se informa desde Australia, que durante el período de prueba, las vacas de control produjeron 2,86 l más de leche y 0,14 kg más de materia grasa al día y habían ganado 10,6 kg más de peso vivo que las vacas infestadas.

5 El vector principal de *Theileria parva*, causante de la fiebre de la costa este y de la enfermedad de Corridor en el ganado bovino, es un miembro más del género *Rhipicephalus*, concretamente *Rhipicephalus appendiculatus*, la garrapata marrón de la oreja. Se plantea la hipótesis de que la saliva de *R. appendiculatus* contiene una toxina y si un gran número de garrapatas infestan a un animal, esta toxina puede interferir con los procesos inmunitarios del hospedador, produciendo una pérdida de condición y brotes de babesiosis, anaplasmosis y cowdriosis (hidrocarditis) en animales que anteriormente eran inmunes a estas enfermedades. Las infestaciones graves pueden conducir al arrugamiento de la oreja y pueden producirse infestaciones de la oreja con las larvas de *Chrysomya bezziana*. La garrapata también es responsable de la transmisión de *Rickettsia conorii* a seres humanos.

Otro miembro más del género *Rhipicephalus*, concretamente *R. zambeziensis*, es el vector de la enfermedad de Corridor (causada por *Theileria parva*), de la teileriosis bovina benigna (causada por *Theileria taurotragi*) y de la erliquiosis causada por *Ehrlichia bovis*.

El control químico utilizando acaricidas es clave en los esfuerzos para erradicar el género *Rhipicephalus*, tal como *R. microplus* y *R. decoloratus*, sin embargo, las garrapatas han desarrollado resistencia a la mayoría de los agentes utilizados hasta ahora, tales como los organofosforados, piretroides, amidinas y lactonas macrocíclicas. Por tanto, sería ventajoso tener más medios disponibles que puedan servir para controlar a las garrapatas del género *Rhipicephalus*.

20 **Sumario**

Se puede considerar que la presente divulgación está relacionada, en general, con el control de uno o más ectoparásitos de *Rhipicephalus* al proporcionar la secuencia de ácido nucleico y el polipéptido así codificado del nAChR de *Rhipicephalus* y por tanto proporcionar un procedimiento para identificar los compuestos adecuados para el control de las garrapatas del género *Rhipicephalus*

25 La molécula de ácido nucleico según la presente invención contiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 9. La molécula de ácido nucleico también puede ser un fragmento de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 9, al tiempo que dicho fragmento codifica un fragmento funcional de una subunidad del receptor nACh.

En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico según la invención, contienen una o más regiones reguladoras tales como un promotor. Dicha región reguladora respectiva está unida operativamente a las secuencias anteriores.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido. El polipéptido está codificado por una molécula de ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos según la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 9.

El polipéptido puede expresarse mediante un vector que incluya las secuencias de nucleótidos según la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 9.

35 El polipéptido es una subunidad de un receptor nACh, que es una subunidad funcional del receptor nACh. En algunas realizaciones, el polipéptido según la invención, está incluido en un homopentámero. Del mismo modo, puede considerarse que el homopentámero respectivo define el receptor nACh.

En realizaciones en las que el polipéptido define un fragmento de una subunidad del receptor nACh, este fragmento generalmente se define por una secuencia de aminoácidos de una longitud continua.

40 Las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, que son secuencias de nucleótidos seleccionadas del listado que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 9, son heterólogas a muchas células hospedadoras en las que se pueden transfectar para la expresión de los respectivos polipéptidos codificados de ese modo y, por lo tanto, estas secuencias heterólogas de ácido nucleico pueden incluirse en una célula hospedadora que contenga entonces una secuencia de nucleótidos según la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 9. La secuencia heteróloga de ácido nucleico también puede ser un fragmento funcional de dicha secuencia de nucleótidos según la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 9. Dicho fragmento codificado por la secuencia heteróloga de ácido nucleico es una parte de una subunidad funcional del receptor nACh.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de identificación de un compuesto capaz de modular la actividad de un receptor nACh de *Rhipicephalus*. El procedimiento incluye poner en contacto un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos seleccionada del listado que consiste en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 9, con un compuesto que se sospecha que modula la actividad de un receptor nACh de *Rhipicephalus*. El procedimiento incluye además detectar la actividad del polipéptido según el tercer aspecto.

El procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro*. En dicho procedimiento, el polipéptido puede incluirse en una célula hospedadora. Como ejemplo adicional, el procedimiento también puede basarse en el uso de un polipéptido

enriquecido. El procedimiento también puede basarse en el uso de un polipéptido aislado o purificado. El polipéptido también puede, por ejemplo, reconstituirse en una capa lipídica, tal como una doble capa lipídica.

La detección de la actividad del polipéptido se basa generalmente en el uso del polipéptido según la presente invención, ya sea incluido en una célula hospedadora o de otra manera, en forma de un pentámero. El polipéptido puede usarse en forma de un homopentámero.

La detección de la actividad del polipéptido de acuerdo con esto puede incluir detectar una corriente, tal como una corriente interna, de un catión. Como ejemplos de un catión adecuado se incluyen, pero sin limitación, Na⁺ y K⁺. La detección puede realizarse, por ejemplo, mediante una medición del voltaje. La detección puede realizarse, por ejemplo, a través de una técnica de detección espectroscópica, fotoquímica, fotométrica o fluorométrica adecuada, generalmente en combinación con un colorante. La detección de la actividad del polipéptido puede incluir una medición de control. Dicha medida de control puede basarse en el uso de un ligando del polipéptido según el tercer aspecto. Un ligando del polipéptido es, por ejemplo, acetilcolina. Además, una medición de control puede basarse en el uso de un compuesto que se sabe que no causa ninguna corriente cuando se pone en contacto con el polipéptido. Una medición de control también puede basarse en el uso de un compuesto que se sabe que bloquea la actividad del polipéptido.

La detección de la actividad del polipéptido puede incluir comparar la actividad detectada del polipéptido, cuando se pone en contacto con un compuesto que se sospecha que modula la actividad de un receptor nACh de *Rhipicephalus*, con una medición de control. La detección de la actividad del polipéptido también puede incluir comparar la actividad detectada con un valor umbral. Un valor umbral respectivo puede ser un valor predeterminado.

El procedimiento puede ser un procedimiento para determinar si un compuesto tiene actividad agonista o antagonista en relación con un receptor nACh de *Rhipicephalus*.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** ilustra la situación y clasificación de las diversas subunidades de los receptores nicotínicos de acetilcolina de *R. microplus*.

La **Figura 2** representa la secuencia de ADNc clonada de nAChRa5 de *R. microplus* (Rma5), SEQ ID NO: 1. La secuencia incluye la metionina START (de inicio) y el codón STOP (de terminación).

La **Figura 3** representa la secuencia de aminoácidos de la secuencia clonada de nAChRa5 de *R. microplus* (Rma5), SEQ ID NO: 2. Los bucles esperados en el polipéptido plegado se indican con líneas, las regiones transmembrana (TM) esperadas se indican con recuadros.

La **Figura 4** representa la secuencia de ADNc clonada de una primera variante de corte y empalme de nAChRa6 de *R. microplus* (Rma6), SEQ ID NO: 3, incluyendo la metionina START y el codón STOP. La región subrayada representa la diferencia con una segunda variante de corte y empalme identificada, representada en la figura 16.

La **Figura 5** representa la secuencia de aminoácidos de la secuencia clonada de la primera variante de corte y empalme de nAChRa6 de *R. microplus* (Rma6), SEQ ID NO: 4. Los bucles esperados en el polipéptido plegado se indican con líneas, las regiones transmembrana (TM) esperadas se indican con recuadros.

La **Figura 6** representa los resultados de experimentos sobre la formación de receptores nicotínicos de acetilcolina funcionales de *R. microplus* en ovocitos de *Xenopus*. El ADNc de longitud completa de subunidades identificadas de nAChR de *R. microplus*, se clonaron en el vector pCR4 o pGEMHE, y la identidad de la(s) subunidad(es) respectiva(s) se evaluó mediante secuenciación. El ARNc se sintetizó y se inyectó en ovocitos desfolículos de *Xenopus*, y después de 72 horas, se analizó la presencia de receptores funcionales, utilizando la técnica de fijación de voltaje de dos electrodos.

La **Figura 7** muestra la expresión de nAChRa5 y nAChRa6 de *R. microplus* durante las fases de vida de *R. microplus*. La expresión génica se normalizó en función de la expresión génica del canal de sodio.

La **Figura 8** representa la secuencia completa de ácido nucleico de nAChRa5 de *R. microplus* (Rma5), SEQ ID NO: 20, como se identifica en el transcriptoma de *R. microplus*. La secuencia incluye las UTR (*untranslated regions*, regiones no traducidas) 5' y 3'. Los extremos 5' y 3' se confirmaron después de amplificación RACE (siglas del inglés, *Rapid Amplification of cDNA Ends*, amplificación rápida de extremos de ADNc), clonación y secuenciación.

La **Figura 9** representa la secuencia completa de ácido nucleico de nAChRa6 de *R. microplus* (Rma6), SEQ ID NO: 21, ensamblada después de amplificación RACE en los extremos 5' y 3', clonación y secuenciación. La secuencia incluye las UTR (*untranslated regions*, regiones no traducidas) 5' y 3'.

La **Figura 10** muestra curvas de respuesta a la dosis de acetilcolina y espinosad en ovocitos de *Xenopus* que expresan homopentámeros de Rma5 (subunidades de SEQ ID NO: 2).

La **Figura 11A** representa un trazado representativo que muestra una respuesta de un homopentámero de Rma5 (subunidades de SEQ ID NO: 2) a la aplicación de acetilcolina (ACh, 300 μ M).

La **Figura 11B** representa un trazado representativo que muestra una respuesta de Rma5 de *R. microplus* a la aplicación de espinosad (30 μM).

La **Figura 12A** muestra una respuesta representativa de Rma6 a ACh (10 μM) antes de la aplicación previa de 30 μM de espinosad.

5 La **Figura 12B** muestra una respuesta representativa de Rma6 a ACh (10 μM) después de la aplicación previa de 30 μM de espinosad.

La **Figura 13** representa una curva de respuesta a la dosis de acetilcolina en ovocitos de *Xenopus* que expresan homopentámeros de Rma6 (subunidades de SEQ ID NO: 4).

10 La **Figura 14A** representa respuestas representativas de homopentámeros de Rma6 a ACh (10 μM) después de una aplicación previa de espinosad durante 15 seg. Los valores indicados son la concentración de espinosad utilizada en la aplicación previa durante 15 seg en μM . Se utilizaron las siguientes concentraciones: 0 μM , 0,1 μM , 0,3 μM , 1 μM , 3 μM , 10 μM y 30 μM . La **Figura 14B** representa una copia de la figura 14A, mostrando menos trazados para facilitar la referencia. Se muestran trazados de las siguientes concentraciones: 0 μM , 0,3 μM , 3 μM y 30 μM .

15 La **Figura 15** muestra una respuesta representativa de Rma6 a imidacloprid (100 μM).

La **Figura 16** representa la secuencia de ADNc clonada de una segunda variante de corte y empalme de nAChR α 6 de *R. microplus* (Rma6), SEQ ID NO: 5, incluyendo la metionina START y el codón STOP. La región subrayada representa la diferencia con la primera variante de corte y empalme identificada, representada en la figura 4.

20 La **Figura 17** representa la secuencia de aminoácidos de la secuencia clonada de la segunda variante de corte y empalme de nAChR α 6 de *R. microplus* (Rma6), SEQ ID NO: 6. La región subrayada difiere de la primera variante de corte y empalme identificada, representada en la figura 5.

Descripción detallada

25 En el presente documento se proporcionan medios para explorar la idoneidad de compuestos como agentes plaguicidas para el control de garrapatas de *Rhipicephalus*. En particular, se proporciona un sistema de ensayo que se basa en técnicas que están bien establecidas en la materia. Además, se proporcionan compuestos fácilmente disponibles y obtenibles que son adecuados para el control de garrapatas de *Rhipicephalus*. También se proporcionan secuencias de ácido nucleico que codifican subunidades del receptor nicotínico de acetilcolina y polipéptidos que representan dichas subunidades de receptores.

Definiciones

30 Salvo que se indique de otra manera, los siguientes términos o expresiones que se utilizan en el presente documento, que se incluyen en la descripción y en las reivindicaciones, tienen las definiciones dadas a continuación.

35 La palabra "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere a un valor que está en un intervalo de error aceptable para el valor particular, determinado por un experto en la materia, que dependerá, en parte, de cómo se mida o determine el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, según la práctica en la materia, "aproximadamente" puede significar un valor de 1 o mayor de 1, que se incluye en una desviación estándar. El término "aproximadamente" también se utiliza para indicar que la cantidad o el valor en cuestión puede ser el valor designado o algún otro valor que sea aproximadamente el mismo. Como se describe en el presente documento, la frase pretende transmitir que valores similares promueven resultados o efectos equivalentes. En este contexto, "aproximadamente" puede referirse a un intervalo superior y/o inferior de hasta el 10 %. En algunas realizaciones, la palabra "aproximadamente", se refiere a un intervalo que está por encima y por debajo de un determinado valor que es de hasta el 5 %, tal como de hasta el 2 %, hasta el 1 % o hasta el 0,5 % por encima o por debajo de ese valor. En una realización, "aproximadamente" se refiere a un intervalo de hasta el 0,1 % por encima y por debajo de un valor determinado.

45 El término "detectar" o "detectando", así como el término "determinar" o "determinando", cuando se usa en el contexto de una señal, tal como una corriente, se refiere a cualquier procedimiento que pueda usarse para detectar el flujo de iones. La detección puede realizarse tanto a nivel cualitativo como cuantitativo. Cuando en el presente documento, las palabras "detectar", "detectando", "determinar" o "determinando", se usan en combinación con las palabras "nivel", "cantidad" o "valor", se entiende que, generalmente, se refieren a un nivel cuantitativo más que cualitativo. Por consiguiente, un procedimiento, como se describe en el presente documento, puede incluir una cuantificación de una corriente.

50 Una "cantidad eficaz" de un compuesto, tal como un compuesto plaguicida, es una cantidad - ya sea como una dosis única o como parte de una serie de dosis - suficiente para proporcionar un beneficio deseado en el control de plagas, en particular, para reducir el número de organismos causantes de plagas en un sujeto, tal como un animal. Un beneficio respectivo también puede ser una reducción en la reproducción o viabilidad de un organismo causante de plaga, o un

beneficio en el tratamiento o gestión de una afección patológica no deseada, o para retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados a la presencia de la afección. Dicha afección puede estar asociada a una infestación o ser el resultado de la misma.

5 Se entiende que la expresión "consiste esencialmente en" permite la presencia de componentes adicionales en una muestra o una composición, que no influyen en las propiedades de la muestra o de una composición. Como ejemplo ilustrativo, una composición farmacéutica puede incluir excipientes si esencialmente esta consiste en un principio activo.

10 La expresión "que expresa" y el término "expresión", en referencia a un polipéptido, deben entenderse en el sentido habitual utilizado en la materia. Una célula expresa un polipéptido mediante la transcripción de un ácido nucleico en ARNm, seguido de la traducción a un polipéptido inicial, que se pliega y posiblemente además se procesa para obtener un polipéptido maduro. Los polipéptidos mencionados en la presente divulgación, también se transportan a la superficie de la célula respectiva y se integran en la membrana celular. Por lo tanto, la afirmación de que una célula está expresando dicho polipéptido, indica que el polipéptido se encuentra en la superficie de la célula e implica que la maquinaria de expresión de la célula respectiva, ha sintetizado el polipéptido.

15 Con respecto al propio proceso biológico respectivo, el término "expresión" y las frases "expresión génica" o "que expresa", se refieren a todas las rutas reguladoras que transforman la información codificada en la secuencia de ácido nucleico de un gen, primero en ARN mensajero (ARNm) y después en un polipéptido. Por consiguiente, la expresión de un gen incluye su transcripción en un ARNhn (ARN heterogéneo nuclear) primario, el procesamiento de este ARNhn en un ARN maduro y la traducción de la secuencia de ARNm en la secuencia de aminoácidos correspondiente del polipéptido. En este contexto, también se observa que la expresión "producto génico" no sólo se refiere a un polipéptido, incluido, por ejemplo, un polipéptido maduro (incluida una variante de corte empalme del mismo) codificado por ese gen y a una proteína precursora respectiva cuando proceda, sino también al ARNm respectivo, que puede considerarse como el "primer producto génico" durante el transcurso de la expresión génica.

20 Por "fragmento", en referencia a un polipéptido, tal como una molécula receptora, se entiende cualquier secuencia de aminoácidos presente en un polipéptido correspondiente, siempre que sea más corta que la secuencia de longitud completa y sea capaz de realizar la función de interés de la proteína, en el caso de un receptor ionotrópico en forma de un canal iónico dependiente de ligando, la difusión de iones, incluyendo una corriente resultante, a través del canal, en respuesta a un ligando específico.

30 Un nAChR (receptor nicotínico de acetilcolina) funcional, como se usa en el presente documento, es un receptor que muestra una actividad de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), según lo evaluado por cualquier técnica de detección *in vitro* o *en vivo* desvelada en el presente documento o conocida por los expertos en la materia. La posesión de cualquier actividad de este tipo, que pueda evaluarse mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia y que se proporciona en el presente documento, es suficiente para designar un receptor como funcional. Cuando se hace referencia a una subunidad funcional de un nAChR, una subunidad respectiva tiene la capacidad de combinarse con otras subunidades y/o fragmentos de subunidades funcionales, de un nAChR, formando así un nAChR funcional. Como procedimientos para detectar la proteína del nAChR y/o la actividad del mismo, se incluyen, por ejemplo, ensayos que miden la unión de la nicotina, el flujo de iones ^{86}Rb , el flujo de entrada de Ca^{2+} , y/o la respuesta electrofisiológica de células que contienen una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica una o más subunidades del receptor. Dado que no todas las combinaciones de las subunidades alfa y beta pueden formar receptores funcionales, para caracterizar completamente una subunidad particular y las células que la producen, se deben someter a ensayo numerosas combinaciones de subunidades alfa y beta. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, "funcional", con respecto a un nAChR recombinante o heterólogo, o a un fragmento del mismo, significa que el canal receptor tiene la capacidad de proporcionar y regular la entrada de iones permeables al nAChR (receptor nicotínico de acetilcolina), tales como, por ejemplo, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Ba^{2+} , en respuesta a un estímulo y/o a ligandos de unión con afinidad conocida por el receptor. Habitualmente, será ventajoso, seleccionar un entorno en el que dicha actividad del nAChR pueda diferenciarse de cualquier actividad del nAChR endógeno que pueda producir la célula hospedadora, por ejemplo, a través de medios electrofisiológicos, farmacológicos y otros medios conocidos por los expertos en la materia.

50 Como se usa en el presente documento, una molécula "heteróloga" de ácido nucleico o una secuencia "heteróloga" de ácido nucleico, es una molécula y secuencia de ácido nucleico, respectivamente, que no aparece de manera natural como parte del genoma de la célula en la que se encuentra, o una secuencia de ácido nucleico que se encuentra en una ubicación o ubicaciones en el genoma que difiere de la que aparece en la naturaleza. Habitualmente, una molécula y/o secuencia heteróloga de ácido nucleico lleva, o es, una secuencia que no es endógena a la célula hospedadora y se ha introducido artificialmente en la célula. La célula que expresa una secuencia heteróloga de ácido nucleico puede contener ADN que codifica los mismos productos de expresión, o diferentes productos de expresión. Una secuencia heteróloga de ácido nucleico no necesita expresarse y puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora o mantenerse de manera episódica.

60 El término "inhibir" una garrapata se refiere a una disminución en el número de garrapatas vivas, independientemente de su fase de vida, o una disminución en el número de garrapatas adultas, larvas ninfas o huevos viables. El grado de reducción alcanzado por un compuesto depende, por supuesto, de la tasa de aplicación del compuesto, del compuesto

particular utilizado y de la especie de garrapata diana. Se debe utilizar al menos una cantidad inactivadora.

El término "aislado(a)" indica que la(s) célula(s) o el (los) péptido(s) o la(s) molécula(s) de ácido nucleico, se ha(n) eliminado de su entorno fisiológico normal, por ejemplo, una fuente natural, o que se sintetiza un péptido o ácido nucleico. El uso del término "aislado(a)" indica que una secuencia de origen natural se ha eliminado de su entorno celular normal (es decir, cromosómico). Por tanto, la secuencia puede estar en una solución acelular o colocada en un entorno celular diferente. Una o más células aisladas pueden incluirse, por ejemplo, en un medio diferente, tal como una solución acuosa que se proporcionó originalmente, o colocarse en un entorno fisiológico diferente. Habitualmente, las células, los péptidos o la(s) molécula(s) de ácido nucleico aislados, constituyen una fracción más alta de las células, péptidos o molécula(s) de ácido nucleico totales presentes en su entorno, por ejemplo, solución/suspensión según corresponda, que en el entorno del que fueron recogidos. Un polipéptido o una molécula de ácido nucleico aislado es un oligómero o un polímero de aminoácidos (2 o más aminoácidos) o nucleótidos acoplados entre sí, incluyendo un polipéptido o una molécula de ácido nucleico que se aísla de una fuente natural o que se sintetiza. El término "aislado" no implica que la secuencia sea la única cadena de aminoácidos o cadena de nucleótidos presente, sino que carezca esencialmente, por ejemplo, con una pureza de aproximadamente 90-95 % o mayor, por ejemplo, de material que no sea de aminoácido ni de ácido nucleico, respectivamente, asociado con ello de manera natural.

El término "lugar", cuando se utiliza en relación con las garrapatas, se refiere al entorno en el que vive una garrapata o en el que están presentes sus huevos, larvas o ninfas, incluido el aire que las rodea, el alimento que ingieren o los objetos o materiales con los que se pone en contacto. Un compuesto activo puede aplicarse, por ejemplo, a la hierba donde viven las larvas. Las garrapatas adultas pueden controlarse aplicando el compuesto activo al animal que está infestado, por ejemplo, por vía tópica. La administración oral de los compuestos desvelados en el presente documento puede realizarse mezclando el compuesto en el alimento o en el agua que bebe el animal, en complementos vitamínicos o minerales, o administrando formas de dosificación oral tales como brebajes, comprimidos, bolos, bloques salinos sal o cápsulas. Se contempla que los compuestos también podrían ser útiles para proteger textiles, papel, grano almacenado, o semillas aplicando un compuesto activo a dicha sustancia.

Un compuesto que "modula la actividad de un nAChR" se refiere a un compuesto que altera la actividad del nAChR de modo que la actividad del nAChR es diferente en presencia del compuesto que en ausencia del compuesto o señal. Dichos compuestos pueden incluir agonistas, agonistas inversos y antagonistas. El término agonista se refiere a una sustancia, tal como ACh, que activa la función del receptor. El término agonista también se refiere a un agonista parcial. Habitualmente, un agonista de un nAChR se une al sitio de unión del agonista del receptor natural, es decir, el sitio de unión a acetilcolina. No obstante, un agonista de un nAChR también puede unirse a un sitio que se solape con el sitio de unión a acetilcolina, pero que no sea idéntico a éste. La expresión agonista inverso es aplicable a un receptor que muestra un nivel de actividad constitutivo, también denominado intrínseco o basal, en ausencia de cualquier ligando. Para dicho receptor, un agonista aumenta la actividad de un receptor por encima de su nivel basal. Un agonista inverso puede unirse al receptor de una manera comparable a la de un agonista, tal como ACh, pero disminuye la actividad por debajo del nivel basal. Un agonista, incluyendo un agonista inverso, puede inducir o no la desensibilización del receptor. Sin limitarse a la teoría, puede contemplarse que exista una forma inactiva y activa de un AChR unido a un ligando. La idea subyacente, también denominada modelo de activación del receptor de dos estados, puede suponerse que es análoga a la del concepto de Michaelis y Menten de que la conversión enzimática de un sustrato prosigue como un proceso de dos etapas que implica la formación de un complejo inactivo. Como resultado, se puede hacer una distinción entre la unión del ligando y la activación del receptor, y se pueden contemplar diferentes estados del receptor con parámetros cinéticos que determinan la tasa de conversión entre estos estados. El término antagonista se refiere a una sustancia que interfiere con la función del receptor. Habitualmente, el efecto de un antagonista y de un agonista inverso se observa como un bloqueo de la activación por parte de un agonista. Un antagonista puede ser un antagonista competitivo o no competitivo. Un antagonista competitivo, o bloqueador competitivo, interactúa con el sitio específico del agonista, o cerca del mismo, por ejemplo, ACh, para el mismo sitio o uno muy cercano. Un antagonista o bloqueador no competitivo inactiva el funcionamiento del receptor al interactuar con un sitio que no sea el sitio que interactúa con el agonista del receptor natural, es decir, el sitio de unión a acetilcolina.

Como se usa en el presente documento, nAChR o receptor nACh significa receptor nicotínico de acetilcolina.

La expresión "molécula de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier ácido nucleico en cualquier configuración posible, tal como monocatenario, bicatenario o una combinación de los mismos. Como ejemplos de ácidos nucleicos se incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN, moléculas de ARN, análogos del ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos o usando química de ácido nucleico, moléculas de ácido nucleico bloqueado (LNA, siglas del inglés *locked nucleic acid molecules*), moléculas de ácido proteonucleico (PNA, siglas del inglés *protein nucleic acid*), moléculas de ácido nucleico de alquilfosfonato y alquilfosfotriéster y moléculas de tecto-ARN (por ejemplo, Liu, B., y col., J. Am. Chem. Soc. (2004) 126, 4076-4077). El LNA tiene una cadena principal de ARN modificada con un puente de metileno entre el C4' y el O2', proporcionando a la molécula respectiva una mayor estabilidad de la doble cadena y resistencia a nucleasas. Las moléculas de ácido nucleico de alquilfosfonato y alquilfosfotriéster pueden considerarse que son como una molécula de ADN o ARN, en la que los grupos fosfato de la cadena principal del ácido nucleico se neutralizan intercambiando los grupos P-OH de los grupos fosfato en la cadena principal del ácido nucleico por un grupo alquilo y por un grupo alcoxi, respectivamente. El ADN o ARN puede ser de origen genómico o sintético y puede ser monocatenario o bicatenario. Dicho ácido nucleico puede ser, por

ejemplo, ARNm, ARNc, ARN sintético, ADN genómico, ADN sintético de ADNc, un copolímero de ADN y ARN, oligonucleótidos, etc. Un ácido nucleico respectivo puede contener además análogos de nucleótidos no naturales y/o puede estar unido a una etiqueta de afinidad o a un marcador.

5 Se conocen muchos análogos de nucleótidos y pueden utilizarse para los ácidos nucleicos que se utilizan en los procedimientos descritos en el presente documento. Un análogo de nucleótido es un nucleótido que contiene una modificación, por ejemplo, en la base, en el azúcar o en los residuos de fosfato. Como ejemplo ilustrativo, se sabe que la sustitución de los residuos 2'-OH de ARNip por residuos 2'F, 2'O-Me o 2'H mejora la estabilidad *in vivo* del ARN respectivo. Las modificaciones en el residuo de base pueden ser una modificación natural o sintética de A, C, G y T/U, de una base diferente de purina o pirimidina, tal como uracil-5-ilo, hipoxantina-9-ilo y 2-aminoadenin-9-ilo, así como de una base de nucleótidos no purínica o no pirimidínica. Otros análogos de nucleótidos actúan como bases universales. Como ejemplos de bases universales se incluyen 3-nitropirrol y 5-nitroindol. Las bases universales pueden formar un par de bases con cualquier otra base. Las modificaciones de bases a menudo se pueden combinar, por ejemplo, con una modificación de azúcar, tal como, por ejemplo, 2'-O-metoxietilo, por ejemplo, para conseguir propiedades exclusivas, tales como mayor estabilidad de la doble cadena.

15 Las expresiones "unido de manera operativa" o "unido operativamente", como se usan en el presente documento, se refieren a la relación funcional de los ácidos nucleicos con las secuencias de nucleótidos reguladoras y efectoras, tales como promotores, potenciadores, sitios de parada transcripcionales y traduccionales, y otras secuencias de señal. Por ejemplo, la unión operativa de ácidos nucleicos con un promotor se refiere a la relación física y funcional entre los ácidos nucleicos y el promotor, de tal manera que la transcripción de dichos ácidos nucleicos se inicia desde el promotor mediante una ARN polimerasa que reconoce y se une específicamente a los ácidos nucleicos y que los transcribe. Para optimizar la expresión y/o la transcripción *in vitro*, puede ser ventajoso eliminar o alterar partes de un clon no traducidas en los extremos 5' y/o 3', por ejemplo, para eliminar posibles codones de iniciación (es decir, de inicio) de traducción alternativos extra, u otras secuencias que puedan interferir con la expresión o reducirla, ya sea a nivel de la transcripción o de la traducción. En algunas realizaciones, para mejorar la expresión, pueden insertarse sitios consenso de unión a ribosoma inmediatamente en el extremo 5' del codón de inicio. Para la expresión de subunidades del nAChR en ovocitos de anfibios, también puede ser ventajoso, rodear la secuencia codificante de la subunidad, con secuencias no traducidas de los extremos 5' y 3', del gen de la β -globina de *Xenopus*, para una producción óptima de proteínas.

25 Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente y se refieren a un polímero de restos de aminoácidos y no están limitados a una determinada longitud mínima del producto. Cuando en la técnica los dos términos se usan simultáneamente, esta doble denominación explica el uso de ambos términos juntos.

30 Se entiende que el término "purificado" es una indicación relativa en comparación con el entorno original de la célula, representando así una indicación de que la célula es relativamente más pura que en el entorno natural. Por lo tanto, incluye, pero no solo se refiere a, un valor absoluto en el sentido de pureza absoluta de otras células (tal como una población celular homogénea). En comparación con el nivel natural, generalmente, el nivel después de purificar la célula será al menos 2-5 veces mayor (por ejemplo, en términos de células/ml). Se contempla expresamente la purificación de al menos un orden de magnitud, tal como aproximadamente dos o tres órdenes, incluyendo, por ejemplo, aproximadamente cuatro o cinco órdenes de magnitud. Puede desearse obtener la célula al menos esencialmente exenta de contaminación, en particular, exenta de otras células, a un nivel funcionalmente significativo, por ejemplo, a una pureza de aproximadamente 95 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 %. Con respecto a un ácido nucleico, un péptido o una proteína, lo anterior se aplica según corresponda. En este caso, la purificación del ácido nucleico, del péptido o de la proteína será, por ejemplo, generalmente al menos 2-5 veces mayor (por ejemplo, en términos de mg/ml).

45 En el presente documento, la palabra "recombinante" se usa para describir una molécula de ácido nucleico que, debido a su origen, manipulación, o ambas cosas, no está asociada a toda o a una parte de la molécula de ácido nucleico con la que está asociada en la naturaleza. Generalmente, una molécula de ácido nucleico recombinante incluye una secuencia que no aparece de manera natural en el organismo o en la célula de tipo silvestre respectivo. Habitualmente, una molécula de ácido nucleico recombinante se obtiene mediante genomodificación, normalmente construida fuera de una célula. Generalmente, una molécula de ácido nucleico recombinante es esencialmente idéntica y/o esencialmente complementaria, a al menos una parte de la molécula de ácido nucleico correspondiente que se produce en la naturaleza. Una molécula de ácido nucleico recombinante puede tener cualquier origen, tal como un origen genómico, de ADNc, de mamífero, bacteriano, vírico, semisintético o sintético. El término "recombinante" como se usa con respecto a una proteína/polipéptido, significa un polipéptido producido por expresión de un polinucleótido recombinante.

50 Condiciones "rigurosas" es un término comúnmente utilizado en la técnica. Las condiciones rigurosas son condiciones en las cuales una primera secuencia de ácido nucleico solo se hibridará con una segunda secuencia de ácido nucleico, si las dos secuencias tienen una alta homología. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Se pueden seleccionar condiciones rigurosas para que sean aproximadamente 5-10° C inferiores al punto de fusión (Tf) térmico para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. Como ejemplo, condiciones de hibridación rigurosas pueden ser una hibridación en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6 x, SDS al 0,5 % a una temperatura de aproximadamente 68° C seguido de uno o más lavados en SSC 2 x, SDS al

0,5 % a temperatura ambiente. Otro ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas es una hibridación en SSC 6 x a una temperatura de aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en SSC 0,2 x, SDS al 0,1 % a una temperatura de aproximadamente 50-65° C.

5 El término "sujeto", como se usa en el presente documento, también dirigido a un individuo, se refiere a un animal, generalmente un mamífero. Un sujeto puede ser una especie de mamífero tal como ganado bovino o una cabra. El sujeto también puede ser una oveja. En algunas realizaciones, el sujeto es un caballo. El sujeto también puede ser un perro o un gato. En algunas realizaciones, el sujeto es un hurón o una chinchilla. En algunas realizaciones, el sujeto es un cerdo. El sujeto también puede ser un mono, un conejo, un ratón, una rata, una cobaya, un hámster, un simio o un ser humano.

10 El término "variante", como se usa en el presente documento, puede referirse a una secuencia de nucleótidos, en la que la secuencia difiere de la secuencia más predominante en una población, por ejemplo, en un nucleótido, en el caso de las mutaciones puntuales descritas en el presente documento. Por ejemplo, algunas variaciones o sustituciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un nAChR, pueden alterar un codón de tal manera que se codifica un aminoácido diferente lo que produce un polipéptido variante. El término "variante" también puede referirse a un polipéptido en el que la secuencia difiere de una secuencia dada como se explica más adelante. Una variante puede ser, por ejemplo, un polipéptido en el que la secuencia difiere de la secuencia más predominante en una población. Una secuencia polipeptídica puede diferir, por ejemplo, en una posición que no cambie la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado, es decir, un cambio conservado. Una secuencia del nAChR mutada, puede codificar polipéptidos variantes.

20 Las expresiones "que comprende", "que incluye", "que contiene", "que tiene", etc., se leerán en forma amplia o abierta y sin limitaciones. Las formas en singular, tales como, "un", "uno(a)", "el" y "la", incluyen referencias en plural, salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, cuando se hace referencia a un "vector" se incluye un solo vector, así como una pluralidad de vectores, ya sea el mismo, por ejemplo, el mismo operón, o uno diferente. Del mismo modo, cuando se hace referencia a una "célula" se incluye una sola célula, así como una pluralidad de células. A menos que se indique otra cosa, debe entenderse que la expresión "al menos", que precede a una serie de elementos, se refiere a cada elemento de la serie. Las expresiones "al menos uno(a)" y "al menos uno(a) de" incluyen, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o cinco o más elementos. Además se entiende, que pueden usarse ligeras variaciones por encima y por debajo de un intervalo establecido para obtener esencialmente los mismos resultados que los de un valor dentro del intervalo. Además, a menos que se indique lo contrario, la divulgación de los intervalos está pensada como un intervalo rango continuo que incluye todos los valores entre el valor mínimo y el máximo.

30 El alcance y el significado de cualquier uso de un término (o expresión) será obvio a partir del contexto específico en el que se utiliza el término (o la expresión). determinadas definiciones adicionales de los términos (y expresiones) seleccionados, utilizados a lo largo del presente documento, se dan en el contexto apropiado de la descripción detallada, según corresponda. A menos que se defina lo contrario, todos los demás términos (y expresiones) científicos y técnicos utilizados en la descripción, en las figuras y en las reivindicaciones, tienen su significado habitual tal como lo entiende comúnmente un experto en la materia.

Acción de los compuestos sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina

40 El control de garrapatas y ácaros se ha centrado en el uso de acaricidas, tales como compuestos de organofosfatos, carbamatos, piretroides, formamidina, amidinas y lactonas macrocíclicas, aunque con éxito limitado. Por otro lado, uno de los insecticidas más ampliamente utilizados es el neonicotinoide imidacloprid. Se sabe que los neonicotinoides, tal imidacloprid, son específicos para el tejido nervioso de los insectos sin afectar a mamíferos o ácaros de la misma manera. Las garrapatas, que son arácnidos en lugar de insectos, también se han considerado como prácticamente no afectadas por el imidacloprid. Por lo tanto, los presentes inventores, se quedaron sorprendidos cuando descubrieron que polipéptidos específicos codificados por secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 9, mostraban especificidad en respuesta a moduladores de los mismos.

50 La acetilcolina es un neurotransmisor que actúa en el sistema nervioso autónomo y en la conexión neuromuscular. En el cerebro, la acetilcolina actúa como neuromodulador. Los receptores de acetilcolina son canales iónicos regulados por agonistas (nAChR) o receptores acoplados a proteína G (mAChR) que a su vez activan canales iónicos. Los nAChR pertenecen a la superfamilia de canales iónicos regulados por neurotransmisores y definen un complejo transmembrana pentamérico (para una revisión general, véase, por ejemplo, Tomizawa y Casida, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. [2005] 45:247-268). La unión de la acetilcolina con un nAChR provoca un giro de 15° de las hélices del receptor, produciendo una apertura transitoria de un poro central que define un canal iónico integral selectivo de cationes. *In vivo*, esto produce el flujo de entrada de sodio y calcio extracelular en la célula, y el flujo de salida de potasio intracelular fuera de la célula, alterando el equilibrio del potencial de membrana. Cuando el flujo de entrada de Na⁺ domina sobre el flujo de salida de K⁺, se produce la despolarización. Los nAChR generalmente tienen un dominio de unión a ligando N-terminal extracelular largo, cuatro regiones transmembrana y un extremo C extracelular.

Se sabe que la selectividad de los insecticidas neonicotinoides es en gran parte atribuible a las diferencias en la unión a los nAChR de insectos en comparación con mamíferos. La nicotina(-) y la acetilcolina tienen un átomo de nitrógeno

cuaternario (sp³), un aceptor de enlaces de hidrógeno, concretamente, un nitrógeno de piridina frente a un oxígeno carboxilo, y un "punto ficticio" que impone direccionalidad al nitrógeno de piridina y al oxígeno, respectivamente (Tomizawa y Casida, 2005, citado anteriormente). A diferencia de esto, los neonicotinoides tienen un grupo nitro o ciano o un residuo electronegativo equivalente, y muestran coplanaridad entre esta punta y un residuo de guanidina/amidina sustituido.

Los nAChR pueden formar homopentámeros y heteropentámeros. En el cuerpo, los receptores de tipo muscular se encuentran en forma de heteropentámeros que contienen las subunidades α_1 , β_1 , γ y δ (forma embrionaria), o en forma de heteropentámeros que contienen las subunidades α_1 , β_1 , δ y ϵ (forma adulta). Se han descubierto subtipos neuronales como subunidades α_2 - α_{10} homoméricas o como subunidades heteroméricas de un tipo de subunidad α respectiva y subunidades β_2 - β_4 . En el caso de los nAChR heteroméricos que contienen subunidades no α , se ha observado que la acetilcolina se une en la interfaz de las regiones N-terminales de las subunidades α y no α . En el caso de homómeros o heteropentámeros que contienen dos subunidades α diferentes, se cree que el sitio de unión de la acetilcolina se forma en la interfaz de dos subunidades α adyacentes (Matsuda y col., Mol. Pharmacol. [2009] 76:1-10).

El sitio de unión al agonista de un nAChR está formado por seis bucles de aminoácidos (bucles AF) distintos. En general, se cree, que en la superficie extracelular de un heteropentámero de un canal de cationes receptor de nAChR hay dos sitios de unión al agonista. Se cree que un homopentámero hay cinco sitios de unión al agonista formados por bucles A-F en los bordes adyacentes de las subunidades. El residuo 2-nitroimino-imidazolidina de un insecticida común, el imidacloprid, experimenta interacciones particulares con restos de tirosina en el bucle C de los receptores de las especies *Lymnaea stagnalis* y *Aplysia californica*, también encontrado en receptores de insectos (Matsuda y col., 2009, citado anteriormente). En las secuencias de las subunidades α_5 y α_6 de *Rhipicephalus* de la presente divulgación, también se encuentra este resto de tirosina, véanse las figuras 3 y 5.

Además, imidacloprid forma enlaces de hidrógeno CH- π con un anillo de triptófano en el bucle B de los nAChR de *Lymnaea stagnalis* y *Aplysia californica*. El residuo de triptófano respectivo está muy conservado y también está presente en las secuencias de las subunidades α_5 y α_6 de *Rhipicephalus* de la presente divulgación. No se cree que este anillo de triptófano esté implicado en la selectividad de los nAChR de insectos por imidacloprid (Matsuda y col., 2009, citado anteriormente).

Además, se ha descubierto que el grupo nitro de imidacloprid forma un enlace de hidrógeno con un resto de glutamina en el bucle D de los nAChR de *Lymnaea stagnalis* y *Aplysia californica*. Los restos correspondientes de los nAChR de insectos son básicos y, por tanto, pueden fijar el grupo nitro de los neonicotinoides a través de una fuerza electrostática. Por lo general, en esta posición se encuentran restos sin carga o con carga negativa, en especies de vertebrados, y se ha pensado que esta posición juega un papel clave en la insensibilidad de los neonicotinoides (Erdmanis y col., Biochemistry [2012] 51, 4627-4629). No obstante, las subunidades α_3 y α_4 de *Homo sapiens*, también contienen un resto básico en esta posición, mientras que las subunidades α_7 de los receptores de vertebrados tienen una glutamina en la posición homóloga en el bucle D. El imidacloprid es un agonista parcial de los últimos receptores. Una subunidad β de un nAChR de la araña lobo, y una subunidad β de la garrapata del ciervo (*Ixodes scapularis*), contienen una glutamina en esta posición (Erdmanis y col., 2012, citado anteriormente).

En las secuencias de la subunidad α_5 de *Rhipicephalus*, puede identificarse un resto de glutamina, sin embargo, en relación con las secuencias de *Lymnaea stagnalis* y *Aplysia californica* este se mueve por una posición en la dirección C terminal, véase la figura 3. En la posición de la glutamina en los receptores de *Lymnaea stagnalis* y *Aplysia californica*, la subunidad α_5 de *Rhipicephalus* tiene un resto ácido en forma de una cadena lateral de ácido aspártico. Las secuencias de la subunidad α_6 de *Rhipicephalus*, no contienen ningún resto de glutamina en el bucle D esperado, véase la figura 5. En lugar de un resto básico, la subunidad α_5 de *Rhipicephalus* tiene un resto ácido y la subunidad α_6 de *Rhipicephalus* tiene treonina, proporcionando así un grupo hidroxilo para un posible enlace de hidrógeno. Sin embargo, la forma en la que en el bucle D de las subunidades de *Rhipicephalus* estos dos restos podrían unirse al imidacloprid, seguiría siendo especulativa.

Como también se explica más adelante, las subunidades α_5 y α_6 de *Rhipicephalus* muestran diferentes características en la unión al ligando. Se descubrió que las respuestas a la ACh eran no desensibilizantes con Rma5, mientras que se descubrió que las respuestas a la ACh eran desensibilizantes con Rma6. Se descubrió que Rma6 estaba activado por un neonicotinoide, mientras que Rma5 estaba activado por un compuesto de espinosina. Estudios anteriores han demostrado que cuando en el bucle D de la subunidad alfa7 del pollo el resto de glutamina se muta a un resto ácido, las respuestas al imidacloprid se reducen significativamente (Shimomura y col., British Journal of Pharmacology [2002] 137, 162-169). Las diferencias de secuencia entre las subunidades α_5 y α_6 de *Rhipicephalus*, pueden explicar las diferencias encontradas por los inventores, cuando se analizaron las corrientes iónicas a través de los receptores de estas dos subunidades.

Además, se han identificado mutaciones del resto X en el motivo YXCC del bucle C de las subunidades α del nAChR que influyen fuertemente en la sensibilidad neonicotinoide de los nAChR (Matsuda y col., 2009, citado anteriormente). Se sabe que la subunidad α_5 de *Rhipicephalus* tiene un resto de prolina en esta posición, que es estéricamente rígido y que contribuye a la formación de un giro. La subunidad α_6 de *Rhipicephalus* tiene una alanina, que proporciona un resto no polar pequeño. En la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, se puede encontrar un resto de prolina,

mientras que en las subunidades α_4 de vertebrados hay un glutamato. En *Lymnaea stagnalis* y *Aplysia californica*, esta posición está ocupada por una serina, que, en *Lymnaea stagnalis*, se pone en contacto con una glutamina en el bucle F, también presente en las subunidades de *Rhipicephalus*. En *Aplysia californica* la serina forma un enlace de hidrógeno con el NO₂ de imidacloprid. En vertebrados, las subunidades α_2 y α_4 , que tienen un resto de ácido glutámico en esta posición, puede suponerse una repulsión electrostática cuando se ponen en contacto con restos ácidos en el bucle F (Matsuda y col., 2009, citado anteriormente).

La expresión de las subunidades α del nAChR en los ovocitos es generalmente difícil de conseguir. Los presentes inventores se sorprendieron al descubrir que las subunidades α_5 y α_6 de *Rhipicephalus* se expresaban muy bien. Por tanto, el uso de nAChR formados por estas subunidades, es particularmente adecuado para procesos de identificación y/u optimización, tales como técnicas de exploración, de un compuesto que actúa como un modulador de los mismos.

La expresión de la subunidad α_5 del nAChR de *Rhipicephalus* no parece variar entre las diferentes fases de vida de la garrapata, véase la figura 7. Por consiguiente, cuando se aplica un compuesto eficaz en la modulación de la actividad de la subunidad α_5 del nAChR de *Rhipicephalus*, se puede esperar que el efecto afecte de la misma manera a adultos, larvas y ninfas. La expresión de la subunidad α_6 del nAChR de *Rhipicephalus* está regulada positivamente, de manera significativa, en adultos en comparación con ninfas y larvas, véase la figura 7. Si se aplica un compuesto eficaz en la modulación de la actividad de la subunidad α_6 del nAChR de *Rhipicephalus*, se puede esperar que el efecto afecte de la misma manera a adultos, larvas y ninfas. Siendo la fase parasitaria de *Rhipicephalus microplus* de aproximadamente 20 a 25 días, una aplicación repetida después de aproximadamente tres semanas puede, por tanto, ser ventajosa en algunas realizaciones. Este periodo de tiempo puede variar para otras garrapatas de *Rhipicephalus*.

Finalmente, debe entenderse que en diversos fragmentos de este documento, *Rhipicephalus microplus* sirve como ejemplo ilustrativo. Sin embargo, en el presente documento se proporcionan procedimientos y agentes para controlar diversas especies del género *Rhipicephalus*. Otros dos ejemplos ilustrativos son *Rhipicephalus annulatus* y *Rhipicephalus appendiculatus*. Incluso, otros dos ejemplos más son *Rhipicephalus aquatilis* y *Rhipicephalus armatus*. Otro ejemplo de una garrapata que puede controlarse usando un procedimiento, un uso, y un compuesto como se describe en el presente documento, es *Rhipicephalus arnoldi*. Dos ejemplos más son *Rhipicephalus bequaerti* y *Rhipicephalus bergeoni*. Otro ejemplo adecuado es *Rhipicephalus boueti*. Otros dos ejemplos son *Rhipicephalus bursa* y *Rhipicephalus camicasi*. Otros dos ejemplos ilustrativos de garrapatas a controlar son *Rhipicephalus capensis* y *Rhipicephalus carnivorialis*. Dos ejemplos más son *Rhipicephalus complanatus* y *Rhipicephalus compositus*. Otros dos ejemplos son *Rhipicephalus congolensis* y *Rhipicephalus cuspidatus*. Otro ejemplo de una garrapata que puede controlarse es *Rhipicephalus decoloratus*. Otros dos ejemplos son *Rhipicephalus deltoideus* y *Rhipicephalus distinctus*. En algunas realizaciones, la garrapata que se controla es una o ambas de *Rhipicephalus duttoni* o *Rhipicephalus dux*. Otros dos ejemplos son *Rhipicephalus evertsi* y *Rhipicephalus exophthalmos*. Dos ejemplos más son *Rhipicephalus sanguineus* y *Rhipicephalus senegalensis*. Una gran cantidad de miembros adicionales del género. *Rhipicephalus* puede controlarse, tal como *Rhipicephalus follis*, *Rhipicephalus fulvus*, *Rhipicephalus geigy*, *Rhipicephalus gertrudae*, *Rhipicephalus glabroscutatum*, *Rhipicephalus guilhoni*, *Rhipicephalus haemaphysaloides*, *Rhipicephalus hoogstraali*, *Rhipicephalus humeralis*, *Rhipicephalus hurti*, *Rhipicephalus interventus*, *Rhipicephalus jeanneli*, *Rhipicephalus kochi*, *Rhipicephalus kohlsi*, *Rhipicephalus leporis*, *Rhipicephalus longiceps*, *Rhipicephalus longicoxatus*, *Rhipicephalus longus*, *Rhipicephalus lounsburyi*, *Rhipicephalus lunulatus*, *Rhipicephalus maculatus*, *Rhipicephalus masseyi*, *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus moucheti*, *Rhipicephalus muehlensi*, *Rhipicephalus muhsamae*, *Rhipicephalus neumanni*, *Rhipicephalus nitens*, *Rhipicephalus oculatus*, *Rhipicephalus oreotragi*, *Rhipicephalus pilans*, *Rhipicephalus planus*, *Rhipicephalus praetextatus*, *Rhipicephalus pravus*, *Rhipicephalus pseudolongus*, *Rhipicephalus pulchellus*, *Rhipicephalus pumilio*, *Rhipicephalus punctatus*, *Rhipicephalus pusillus*, *Rhipicephalus ramachandrai*, *Rhipicephalus rossicus*, *Rhipicephalus scalpturatus*, *Rhipicephalus schulzei*, *Rhipicephalus escultus*, *Rhipicephalus serranoi*, *Rhipicephalus simpsoni*, *Rhipicephalus simus*, *Rhipicephalus sulcatus*, *Rhipicephalus supertritus*, *Rhipicephalus theileri*, *Rhipicephalus tricuspis*, *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus warburtoni*, *Rhipicephalus zambeziensis* y *Rhipicephalus zumpti*.

Secuencias de ácido nucleico que codifican subunidades del receptor nicotínico de acetilcolina y los polipéptidos correspondientes

Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento puede codificar un polipéptido que contenga una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 98 % con la SEQ ID NO: 10. La SEQ ID NO: 10 se representa mediante la siguiente secuencia:

LVAEVDETWSARENDSSSPPPPPLSHEKRLMDSLLRHYDASVRPVKNSSEPVIIRLGITLTQI
 FDLDEKNQVLTTIVWLDQEWFDEYLTWDPLEFGNFSNLRPLCHKIWLPLDIVLYNNADDYT
 RGYFQTRAMIDPQGRVFWPPPTKFRSTCPVDVTFPFDDQVCTMKFGSWIYDGLQVDIQN
 RTSEVDLVNYMPNGEWELLEARMVRNVVYYPCCPDQFPDITVVLVMRRKTLYYMYNV
 VLPCIMMSVLTLLVFCLPPDSGEKIALGVTVLLAFSVFMLAIAEKMPETSESIPLLLGIYLTAV
 MAITSISVVMTVIVLNFHYRGPSPRKEVPAWLRRLLLNKSSSSRGWFSKPARRKTVGDNHV
 HFYDLPSRTAASKDRSDLDDDDVDGSRPAADDTFRLVVDSVVIGSEDRYTRGEYAEHSAS

NESPSPVLHGDMsrnnasgsarhrrcragaasggstkrvqeevlrtrlylmeqkqreeh
 LTRTVNEWRQMALVIDRTLFWFFLIITAVSSVCFLVVIPI

5 Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento puede codificar un polipéptido que contenga una
 secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 99 % con la SEQ ID
 NO: 10. El polipéptido codificado también puede contener una secuencia de aminoácidos que sea un fragmento de
 longitud continua de aproximadamente 150 o más aminoácidos. El polipéptido codificado también puede contener una
 secuencia de aminoácidos que sea un fragmento de una longitud continua de aproximadamente 200 o más, tal como
 10 250 o más aminoácidos. El polipéptido codificado puede contener una secuencia de aminoácidos que sea un
 fragmento de una longitud continua de aproximadamente 300 o más aminoácidos. Dicho fragmento representa un
 polipéptido, que puede tener una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 98 % con la
 SEQ ID NO: 10. El polipéptido codificado incluye una secuencia de aminoácidos que es un fragmento que tiene una
 identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 99 % con la SEQ ID NO: 10.

15 Cualquier fragmento de un polipéptido desvelado en el presente documento puede incluir una secuencia que contenga
 dos o más bucles como se indica en las figuras 3 y 5. El experto en la materia conoce el mapeo de estos bucles, y se
 ha demostrado su relevancia con respecto a la unión con el ligando (por ejemplo, Shimomura y col., 2002, citado
 anteriormente). Un fragmento puede incluir, por ejemplo, una secuencia que contenga los bucles B y D. Un fragmento
 puede incluir una secuencia que contenga los bucles C y D. Un fragmento respectivo puede incluir una secuencia que
 contenga tres o cuatro bucles como se indica en las figuras 3 y 5. Como ejemplo, un fragmento puede incluir una
 secuencia que contenga los bucles B, C y D. Un fragmento también puede incluir una secuencia que contenga los
 bucles B, C, D y F. Un fragmento de un polipéptido desvelado en el presente documento puede incluir una secuencia
 20 que contenga cinco bucles como se indica en las figuras 3 y 5. En algunas realizaciones, un fragmento de un
 polipéptido descrito en el presente documento, puede incluir los seis bucles A a C, como se ilustra en la figura 3 o en
 la figura 5.

25 El polipéptido codificado puede contener una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al
 menos aproximadamente 99,5 %, incluyendo al menos aproximadamente 99,8 %, con la SEQ ID NO: 10. Un fragmento
 incluido en un polipéptido codificado también puede representar un polipéptido que tenga una identidad de secuencia
 de aminoácidos de al menos aproximadamente 99,5 %, incluyendo al menos aproximadamente 99,8 %, con la SEQ
 ID NO: 10.

30 Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento, puede ser una molécula de ácido nucleico que
 se hibride con la secuencia de la SEC ID NO: 10 en condiciones de hibridación rigurosas. Una molécula de ácido
 nucleico desvelada en el presente documento puede ser una molécula de ácido nucleico que se hibride con la
 secuencia de la SEC ID NO: 10 en condiciones de hibridación muy rigurosas.

Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento, también puede codificar un polipéptido que
 contenga una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 98 %
 con la SEQ ID NO: 11. La SEQ ID NO: 11 se representa mediante la siguiente secuencia:

35 LLTAPQDSEQGAHERLLADLLANYNTLERPVLNESEPLILSFGTLTQQIIDVDEKNQLIITNIWLT
 LDWIDVNLRWPNKDYGGVQDLRIPPNKIWKPDVLMYNSADEKFDGTYPTNVVRSNGSCNYIP
 PGIFKSTCKIDITWFPFDDQKCDLKFGSWTYHGYQLDLRVNSEEGLTTTYIPNGEWDLIGVPG
 VRNVREYACCPEPYIDITYTIHIRRRTLYYGFNLIIPCVLISSMTLLGFTLPPDTGERLTLGVITILLSL
 TVFMLQLAETMPPTSDAVSIIGTYFACIMIMVAFSVVMTVVVLNYHHRNQETTEMPALIRTVFLV
 WLPWLLRMEPPGQKANRRSLFLNSKMKELKERSRSLLANVLDI

Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento puede codificar un polipéptido que contenga una

5 secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 96 % con la SEQ ID NO: 11. El polipéptido codificado también puede contener una secuencia de aminoácidos que sea un fragmento de longitud continua de aproximadamente 150 o más aminoácidos. El polipéptido codificado también puede contener una secuencia de aminoácidos que sea un fragmento de una longitud continua de aproximadamente 200 o más, tal como de aproximadamente 250 o más aminoácidos. El polipéptido codificado puede contener una secuencia de aminoácidos que sea un fragmento de una longitud continua de aproximadamente 300 o más aminoácidos. Dicho fragmento representa un polipéptido, que puede tener una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 95 %, tal como de aproximadamente 96 %, con la SEQ ID NO: 11. El polipéptido codificado incluye una secuencia de aminoácidos que es un fragmento que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 95 %, tal como de aproximadamente 96 %, con la SEQ ID NO: 11.

10 En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento puede codificar un polipéptido que contenga una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 98 % con la SEC ID NO: 12. La SEQ ID NO: 12 se representa mediante la siguiente secuencia:

IAVLLTAPQDSEQGAHERLLADLLANYNTLERPVLNESEPLILSFGLTLQIIDVDEKNQLIITNI
 WLTLDWIDVNLRWPNKDYGGVQDLRIPPNIWKPDVLMYNSADEKFDGTYPTNVVRSNGSC
 NYIPPGIFKSTCKIDITWFPFDDQKCDLKFGSWTYHGYQLDLRVNSEEGDLTTYIPNGEWDLIGV
 PGVRNVREYACCPEPYIDITYTIHIRRRTLYYGFNLIIPCVLISSMTLLGFTLPPDTGERLTLGVTL
 LSLTVFMLQLAETMPPTSDAVSIIGTYFACIMIMVAFSVVMTVVVLNYHHRNQETTEMPALIRTV
 15 FLVWLPWLLRMEPPGQKANRRSLFLNSKMKELELKERSRSLLANVLDID

Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento puede codificar un polipéptido que contenga una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 96 % con la SEQ ID NO: 12. El polipéptido codificado también puede contener una secuencia de aminoácidos que sea un fragmento de una longitud continua de aproximadamente 150 o más aminoácidos. El polipéptido codificado también puede contener una secuencia de aminoácidos que sea un fragmento de una longitud continua de aproximadamente 200 o más, tal como de aproximadamente 250 o más aminoácidos. El polipéptido codificado puede contener una secuencia de aminoácidos que sea un fragmento de una longitud continua de aproximadamente 300 o más aminoácidos. Dicho fragmento representa un polipéptido, que puede tener una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 95 %, tal como de aproximadamente 96 %, con la SEQ ID NO: 12. El polipéptido codificado incluye una secuencia de aminoácidos que es un fragmento que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 95 %, tal como de aproximadamente 96 %, con la SEQ ID NO: 12.

Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento, también puede codificar un polipéptido que contenga una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 98 % con la SEQ ID NO: 13. La SEQ ID NO: 13 se representa mediante la siguiente secuencia:

LLTAPQDSEQGAHERLLADLLANYNTLERPVLNESEPLILSFGLTLQIIDVDEKNQIITNVW
 LNLDWIDVNLRWPNKDYGGVQDLRIPPNIWKPDVLMYNSADEKFDGTYPTNVVRSNGSC
 NYIPPGIFKSTCKIDITWFPFDDQKCDLKFGSWTYHGYQLDLRVNSEEGDLTTYIPNGEWDLI
 GVPGVRNVREYACCPEPYIDITYTIHIRRRTLYYGFNLIIPCVLISSMTLLGFTLPPDTGERLTLGVTL
 ILLSLTVFMLQLAETMPPTSDAVSIIGTYFACIMIMVAFSVVMTVVVLNYHHRNQETTEMPALIRTV
 30 VFLVWLPWLLRMEPPGQKANRRSLFLNSKMKELELKERSRSLLANVLDI

Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento puede codificar un polipéptido que contenga una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 96 % con la SEQ ID NO: 13. El polipéptido codificado también puede contener una secuencia de aminoácidos que sea un fragmento de una longitud continua de aproximadamente 150 o más aminoácidos. El polipéptido codificado también puede contener una secuencia de aminoácidos que sea un fragmento de una longitud continua de aproximadamente 200 o más, tal como de aproximadamente 250 o más aminoácidos. El polipéptido codificado puede contener una secuencia de aminoácidos que sea un fragmento de una longitud continua de aproximadamente 300 o más aminoácidos. Dicho fragmento representa un polipéptido, que puede tener una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 95 %, tal como de aproximadamente 96 %, con la SEQ ID NO: 13. El polipéptido codificado incluye una secuencia de aminoácidos que es un fragmento que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 95 %, tal como de aproximadamente 96 %, con la SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento puede codificar un polipéptido que contenga una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de aminoácidos de al

menos aproximadamente 98 % con la SEC ID NO: 14. La SEQ ID NO: 14 se representa mediante la siguiente secuencia:

IAVLLTAPQDSEQGAHERLLADLLANYNTLERPVLNESEPLILSFGLTLQQIIDVDEKNQIITTNV
 WLNLDWIDVNLRWNP KDYGGVQDLRIPPNKIWKPDVLMYNSADEKFDGTYPTNVVVRNSGSC
 NYIPPGIFKSTCKIDITWFPFDDQKCDLKFGSWTYHGYQLDLRVNSEEGLTTYIPNGEWDLIG
 VPGVRNVREYACCPEPYIDITYTIHIRRRTLYYGFNLIIPCVLISMTLLGFTLPPDPTGERLTLGVTI
 LLSLTVFMLQLAETMPPTSDAVSIIGTYFACIMIMVAFSVVMTVVVLNYHHRNQETTEMPALIRT
 VFLVWLPWLLRMEPPGQKANRRSLFLNSKMKELELKERSSRSLLANVLDID

5 Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento, puede contener una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 96 % con la SEQ ID NO: 14. El polipéptido codificado también puede contener una secuencia de aminoácidos que sea un fragmento de una longitud continua de aproximadamente 150 o más aminoácidos. El polipéptido codificado también puede contener una secuencia de aminoácidos que sea un fragmento de una longitud continua de aproximadamente 200 o más, tal como de aproximadamente 250 o más aminoácidos. El polipéptido codificado puede contener una secuencia de aminoácidos que sea un fragmento de una longitud continua de aproximadamente 300 o más aminoácidos. Dicho fragmento representa un polipéptido, que puede tener una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 95 %, tal como de aproximadamente 96 %, con la SEQ ID NO: 14. El polipéptido codificado incluye una secuencia de aminoácidos que es un fragmento que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 95 %, tal como de aproximadamente 96 %, con la SEQ ID NO: 14.

15 Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento, puede contener una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 99 %, incluyendo al menos aproximadamente 99,5 %, con la SEQ ID NO: 2. Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento, puede consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 99 %, incluyendo al menos aproximadamente 99,5 %, con la SEQ ID NO: 2. Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento, puede consistir en una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 99 %, incluyendo al menos aproximadamente 99,5 %, con la SEQ ID NO: 2.

25 Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento, puede contener una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 99 %, incluyendo al menos aproximadamente 99,5 %, con la SEQ ID NO: 4. Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento, puede consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 99 %, incluyendo al menos aproximadamente 99,5 %, con la SEQ ID NO: 4. Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento, puede consistir en una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 99 %, incluyendo al menos aproximadamente 99,5 %, con la SEQ ID NO: 4.

30 Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento, puede contener una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 99 %, incluyendo al menos aproximadamente 99,5 %, con la SEQ ID NO: 6. Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento, puede consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 99 %, incluyendo al menos aproximadamente 99,5 %, con la SEQ ID NO: 6. Una molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento, puede consistir en una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 99 %, incluyendo al menos aproximadamente 99,5 %, con la SEQ ID NO: 6.

40 Las variantes de un polipéptido proporcionadas en el presente documento, pueden prepararse mediante genomodificación de proteínas y/o modificación química, introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido, o mediante síntesis proteica/peptídica. Se puede obtener una variante mediante cualquier combinación de una o más deleciones, sustituciones, adiciones e inserciones en la secuencia de ácidos nucleicos y/o aminoácidos, siempre que el polipéptido obtenido defina una subunidad funcional del receptor nACh. En algunas realizaciones, una variante de un polipéptido proporcionado en el presente documento, difiere en hasta cinco sustituciones de una secuencia particular de un polipéptido proporcionado en el presente documento. Una sustitución en una secuencia de aminoácidos de un polipéptido proporcionado en el presente documento, puede ser una sustitución conservativa. Como ejemplos de sustituciones conservativas se incluyen:

1. La sustitución de alanina (A) por valina (V);
2. La sustitución de arginina (R) por lisina (K);
3. La sustitución de asparagina (N) por glutamina (Q);
4. La sustitución de ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E);
5. La sustitución de cisteína (C) por serina (S);

6. La sustitución de ácido glutámico (E) por ácido aspártico (D);
 7. La sustitución de glicina (G) por alanina (A);
 8. La sustitución de histidina (H) por arginina (R) o lisina (K);
 9. La sustitución de isoleucina (I) por leucina (L);
 10. La sustitución de metionina (M) por leucina (L);
 11. La sustitución de fenilalanina (F) por tirosina (Y);
 12. La sustitución de prolina (P) por alanina (A);
 13. La sustitución de serina (S) por treonina (T);
 14. La sustitución de triptófano (W) por tirosina (Y);
 15. La sustitución de fenilalanina (F) por triptófano (W);
 y/o
 16. La sustitución de valina (V) por leucina (L) y viceversa.

Las secuencias descritas en el presente documento pueden incluir una o más, tal como dos o tres, de dichas sustituciones conservativas. En algunas realizaciones, un polipéptido según la presente divulgación, incluye una secuencia que tiene cuatro o más sustituciones conservativas en comparación con una secuencia desvelada en el presente documento. En algunas realizaciones, un polipéptido incluye una secuencia que tiene cinco o más sustituciones conservativas. En algunas realizaciones, un polipéptido contiene seis o más, tal como siete o más, sustituciones conservativas con respecto a una secuencia desvelada en el presente documento. En algunas realizaciones, un polipéptido puede incluir ocho o nueve de dichas sustituciones conservativas. En algunas realizaciones, un polipéptido según la presente divulgación, puede incluir diez o más de dichas sustituciones conservativas, por ejemplo, once, doce o más, de dichas sustituciones conservativas.

Las sustituciones no conservativas pueden conducir a cambios más sustanciales, por ejemplo, con respecto a la carga, momento dipolar, tamaño, hidrofiliidad, hidrofobicidad o conformación del polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido incluye una o más, tal como dos sustituciones no conservativas. En algunas realizaciones, el polipéptido incluye tres o cuatro sustituciones no conservativas. El polipéptido también puede incluir cinco o más, por ejemplo, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más, de dichas sustituciones no conservativas.

Cabe destacar, que los presentes inventores, han identificado dos variantes de corte y empalme de nAChR α 6 de *R. microplus*. Las secuencias de aminoácidos correspondientes tienen la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 6, como se representa en las figuras 5 y 17. Las variantes de corte y empalme pueden considerarse variantes como se describió anteriormente. La presencia de subunidades de variantes, cortadas y empalmadas de manera diferente, es importante porque los receptores pueden tener un perfil farmacológico diferente y/o las variantes pueden expresarse preferentemente en diferentes tejidos/fases de vida (Hosie y col., Neuroscience [2001] 102, 3: 709-714; Kita y col., Biochem Mol Biol [2014] 45: 1-10). Las transcripciones de corte y empalme alternativas de la subunidad nAChR α 6 se han caracterizado anteriormente en insectos (por ejemplo, Grauso y col., Genetics [2002] 160, 4: 1519-1533; Rinkevich y Scott, Insect Molecular Biology [2009] 18(2): 233-242; Puinean y col., J Neurochem [2013] 124 (5): 590-601) encontrándose diferentes isoformas para los exones 3 y 8. En la garrapata *R. microplus* se descubrieron dos variantes alternativas del exón 3 después de la secuenciación de la transcripción y se denominaron 3a (SEQ ID NO: 5) y 3b (SEQ ID NO: 3) en consenso con la anotación utilizada en otros estudios. Ambas isoformas forman receptores funcionales cuando se expresan en ovocitos de *Xenopus*.

40 Identificación de compuestos adecuados

En un procedimiento de identificación de un compuesto capaz de modular la actividad de un receptor nACh de *Rhipicephalus*, se puede emplear una variedad de técnicas conocidas en la materia. Habitualmente, dichas técnicas permiten la formación de una respuesta electrofisiológica detectable contra un agonista conocido. La respuesta respectiva puede detectarse en forma de mediciones de corrientes iónicas. Para realizar esta tarea, en el comercio se dispone de instrumentos electrofisiológicos automatizados que utilizan matrices planas. Dado que un flujo de iones a través de un canal influye en el potencial de membrana, la respuesta respectiva también puede detectarse utilizando un procedimiento electrofisiológico. Como ejemplo, pueden emplearse mediciones convencionales de electrofisiología de pinzamiento zonal. También pueden detectarse cambios en el potencial de membrana un sistema de coloración, por ejemplo, usando un colorante fluorescente. A este respecto, puede emplearse, por ejemplo, un lector de placa fluorescente con capacidades cinéticas. Pueden utilizarse formatos de placa de 96, 384 o 1 536 pocillos. La respuesta respectiva también puede detectarse basándose en un cambio en la concentración de iones en un lado de una membrana. Esto puede realizarse mediante una señal electromagnética, por ejemplo, mediante un colorante detector que indica la presencia y/o ausencia de determinados iones metálicos. De nuevo, pueden emplearse placas de 96, 384 o 1 536 pocillos. Por ejemplo, puede detectarse un flujo de iones utilizando, como un detector de iones quimioluminiscente, indicadores de flujo de iones, bien establecidos, codificados genéticamente, aecuorina y una proteína fluorescente genomodificada. La concentración de iones también se puede medir directamente usando espectroscopía de absorción atómica o isótopos marcados.

Cuando se usan uno o más colorantes de detección de potencial de membrana, puede aprovecharse la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) si se utiliza un par de colorantes. Se puede usar un primer colorante anclado a fosfolípidos, tal como una cumarina, y un segundo colorante hidrófobo que se redistribuya rápidamente en la membrana según el campo transmembrana.

Donde se desee, un ion fisiológico que pasa a través del receptor nACh *in vivo*, puede reemplazarse por un ion no fisiológico que pueda pasar a través del poro que define un canal. Como una ilustración, el talio pasa fácilmente a través de muchos canales de potasio y puede detectarse con sondas fluorescentes que pueden cargarse en las células.

5 Para tener en cuenta los cambios conformacionales durante la regulación, puede desearse usar un formato de ensayo que pueda controlar la regulación del canal para identificar un compuesto con selectividad funcional. En este sentido, las técnicas de electrofisiología automatizada, los detectores bioquímicos y los lectores de placa, proporcionan una gama de opciones para implementar un ensayo de canal iónico, que pueda detectar la modulación de canales específicos del estado o independientes del estado.

10 Como ejemplo, las células u ovocitos que expresan un polipéptido, como se desvela en el presente documento, en forma recombinante, pueden ponerse en contacto con un compuesto de ensayo, y el (los) efecto(s) modulador(es) del mismo puede(n) evaluarse comparando la respuesta mediada por el AChR en presencia y en ausencia del compuesto de ensayo. La respuesta mediada por el AChR de las células de ensayo, o de las células de control, habitualmente células que para nada expresan los nAChR, o células que no expresan un polipéptido como se desvela en el presente documento, también puede compararse con la presencia del compuesto.

De acuerdo con una realización particular del procedimiento, se puede producir una respuesta electrofisiológica detectable en una célula tal como un ovocito. El procedimiento generalmente incluye expresar un polipéptido, como se desvela en el presente documento, en una superficie celular, tal como una superficie celular de un ovocito. El procedimiento también puede incluir poner en contacto el ovocito con uno o más compuestos de ensayo e identificar la respuesta electrofisiológica.

Como se desvela en el presente documento, un procedimiento puede incluir la introducción de una molécula de ácido nucleico en una célula hospedadora adecuada. En la materia hay técnicas respectivas bien establecidas. En algunas realizaciones, un ácido nucleico, como se desvela en el presente documento, puede incluirse en un casete de expresión. Un casete de expresión generalmente incluye un promotor unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés, que está unida operativamente a una o más señales de terminación. También puede incluir secuencias necesarias para la traducción adecuada de la secuencia de nucleótidos. La región codificante puede codificar un polipéptido de interés y también puede codificar un ARN funcional de interés, incluyendo, pero sin limitación, ARN antisentido o un ARN no traducido, en la dirección en sentido o antisentido. El casete de expresión que contiene la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión también puede ser un casete de origen natural, pero que se ha obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. En algunas realizaciones, el casete de expresión puede ser heterólogo con respecto al hospedador; es decir, la secuencia de ácido nucleico particular del casete de expresión no aparece de manera natural en la célula hospedadora y se introdujo en la célula hospedadora o en un ancestro de la célula hospedadora mediante un suceso de transformación. La expresión de la secuencia de nucleótidos en el casete de expresión, puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicie la transcripción solo cuando la célula hospedadora se exponga a algún estímulo externo particular. En el caso de un organismo multicelular, tal como una planta o un animal, el promotor también puede ser específico para un tejido, órgano o fase de desarrollo particular.

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico como se describe en el presente documento, por ejemplo, una molécula de ARN, puede inyectarse y expresarse en un ovocito. En la materia, las técnicas para inyecciones citoplasmáticas de ARN están bien establecidas. Las inyecciones de ácido nucleico pueden realizarse, por ejemplo, en ovocitos desnudos usando, por ejemplo, un microelectrodo de vidrio y un sistema de inyección disponible en el comercio. Las cantidades de moléculas de ácido nucleico inyectadas en un ovocito pueden variar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 ng por ovocito, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 ng de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico pueden inyectarse en volúmenes de tampón que varían de 10 a 100 nl, incluyendo, por ejemplo, un volumen de tampón de aproximadamente 50 nl.

Como se ha explicado anteriormente, en algunas realizaciones, se puede detectar una respuesta electrofisiológica usando técnicas de fijación de voltaje. Los ovocitos pueden fijarse mediante voltaje, por ejemplo, con un fijador de dos electrodos. Se perfunde un tampón fisiológico adecuado a través de los ovocitos y se obtiene un registro de referencia. Después de obtener un registro de referencia, los ovocitos pueden perfundirse con una solución de registro apropiada (por ejemplo, NaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, KCl 96 mM, Na-HEPES 5 mM, CaCl₂ 1 mM). Las soluciones de ovocitos pueden, por ejemplo, diluirse (p. ej., en H₂O destilada) a partir de soluciones de reserva. Los compuestos de ensayo pueden usarse, por ejemplo, en forma de soluciones de reserva, habitualmente conservando las condiciones iónicas y osmóticas de la solución de registro. después, se puede preparar una dilución en soluciones de registro a una concentración final deseada. Los ovocitos se perfunden con una solución de registro final.

Para registrar corrientes transmembrana, se dispone de amplificadores comerciales. Los electrodos generalmente se llenan con una solución iónica adecuada, y las respuestas se pueden registrar a temperatura ambiente mientras la membrana del ovocito se sujeta con voltaje al potencial de membrana deseado (por ejemplo, -80 mV). También se pueden usar otras configuraciones y equipos conocidos en la materia.

En algunas realizaciones, se puede detectar una respuesta electrofisiológica usando una técnica denominada "pinzamiento zonal". Generalmente, una pequeña zona de la membrana celular se aísla en la punta de una micropipeta presionando la punta contra la membrana. Se ha sugerido que si se establece un cierre hermético entre la micropipeta y la zona de la membrana, la corriente eléctrica puede pasar a través de la micropipeta solo a través de los canales iónicos en la zona de la membrana. Si esto se logra, la actividad de los canales iónicos y su efecto sobre el potencial de membrana, resistencia y corriente, puede monitorizarse. Si el potencial eléctrico a través de la membrana permanece constante, la corriente que se la suministra es igual a la corriente que fluye a través de los canales iónicos en la membrana. El cierre de los canales iónicos en la membrana hace que aumente la resistencia de la membrana. Si la corriente aplicada permanece constante; el aumento de la resistencia está en proporción directa a un aumento del potencial eléctrico a través de la membrana.

Un procedimiento para identificar compuestos que modulen la actividad del nAChR (receptor nicotínico de acetil colina) (por ejemplo, agonistas y antagonistas), habitualmente requiere una comparación con un control. Un tipo de célula de "control" o cultivo de "control" es una célula o un cultivo que se trata esencialmente de la misma manera que la célula o el cultivo expuesto al compuesto de ensayo. La única diferencia con la célula o el cultivo de ensayo es que la célula/cultivo de control no está expuesto a un compuesto de ensayo. Por ejemplo, en un procedimiento que se basa en una técnica electrofisiológica de fijación de voltaje, la misma célula puede someterse a ensayo en presencia y en ausencia de un compuesto de ensayo, simplemente cambiando la solución externa que baña la célula. Otro tipo de célula de "control" o cultivo de "control" puede ser una célula o un cultivo de células que sean idénticas a las células transfectadas, excepto que las células empleadas para el cultivo de control no expresan los nAChR funcionales. En esta situación, la respuesta de la célula de ensayo frente al compuesto de ensayo se compara con la respuesta (o la falta de respuesta) de la célula negativa al receptor (control) frente al compuesto de ensayo, cuando las células o los cultivos de cada tipo de célula se exponen esencialmente a las mismas condiciones de reacción en presencia del compuesto que se está analizando.

En algunas realizaciones, una medición puede compararse con un valor umbral predeterminado. En algunas realizaciones, un valor umbral predeterminado puede establecerse basándose en datos recogidos de mediciones anteriores usando compuestos que se sabe que modulan, por ejemplo, activan o inhiben, la actividad del nAChR. En algunas realizaciones, como valor umbral puede utilizarse un determinado percentil de dichos datos. El intervalo de los valores de un conjunto de datos obtenido de las células se puede dividir en 100 partes iguales, es decir, se pueden determinar porcentajes del intervalo. Un percentil representa el valor dentro del intervalo respectivo por debajo del cual cae un determinado porcentaje de los datos, en otras palabras, el porcentaje de los valores que son más pequeños que ese valor. Por ejemplo, el percentil 95 es el valor por debajo del cual se encuentra el 95 por ciento de los datos. En algunas realizaciones, la actividad del nAChR puede considerarse disminuida o baja si está por debajo del percentil 90, o por debajo del percentil 80. En algunas realizaciones, la actividad del nAChR puede considerarse disminuida o baja si está por debajo del percentil 70.

En algunas realizaciones, se usa un sustrato para uso en la exploración descrita en la solicitud de patente europea EP 1 621 888 en relación con una membrana biológica.

Para que la invención pueda entenderse y ponerse en práctica fácilmente, se describirán ahora realizaciones particulares mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Los ejemplos ilustran técnicas que pueden utilizarse en los procedimientos desvelados en el presente documento, así como realizaciones ejemplares de aislamiento y expresión de una molécula de ácido nucleico y un polipéptido descritos anteriormente.

Materiales

Las garrapatas que se utilizaron en este estudio se criaron en Bayer Animal Health (Monheim, Alemania), en fases de vida recogidas por separado, ultracongeladas en nitrógeno líquido y transportadas en nieve carbónica. Al llegar, las muestras se conservaron a -80° hasta que se necesitaron.

Secuenciación y análisis de transcriptoma

ARN total de alta calidad extraído de un grupo de larvas, ninfas y adultos de *R. microplus* se envió a Eurofins Genomics (Alemania) para la preparación y normalización de una biblioteca de ADNc. El ADNc se secuenció utilizando tecnología Illumina HiSeq2002, utilizando dos carriles completos con un protocolo de extremos emparejados de 1x100 pb.

Después del análisis del transcriptoma, se identificó una secuencia completa de una supuesta subunidad nAChR α 5 (Rma5) y de una supuesta subunidad nAChR α 6 (Rma6) parcial. La secuencia parcial de Rma6 se extendió utilizando amplificación RACE en el extremo 3'. Para amplificar la región codificante del gen, se diseñaron cebadores oligonucleotídicos, que después se clonó en el vector pCR4-TOPO y se verificó mediante secuenciación.

Clonación molecular de Rma5 y Rma6

A partir de un grupo de larvas, ninfas y adultos de garrapatas de ganado bovino, se extrajo ARN total utilizando Trizol (Life Technologies) siguiendo el protocolo del fabricante. A partir de ARN total, se sintetizó ADNc amplificado por RACE, utilizando el kit de FirstChoice RLM-RACE (Ambion) y el kit de transcripción inversa Maxima H (Thermo). La secuencia de la subunidad $\alpha 6$ del nAChR, extraída de la base de datos del transcriptoma, carecía de parte del extremo 3', por lo tanto, inicialmente, se realizó una amplificación por RACE en el extremo 3' para obtener la secuencia que faltaba. Secuencias de Rma5 y Rma6 de longitud completa se amplificaron usando la polimerasa KAPA HiFi (KAPA Biosystems) y las transcripciones se ligaron en el vector pCR4-TOPO TA (Life Technologies). Células de *E. coli* competentes One Shot Top10 (Life Technologies) se transformaron usando los productos ligados y se cultivaron durante la noche a 37° C en placas de agar con LB que contenían ampicilina. Colonias tanto de Rma $\alpha 5$ como de Rma $\alpha 6$ se cultivaron en caldo LB, el ADN plasmídico se aisló usando el kit miniprep de plásmido PureLink™ Quick siguiendo el protocolo del fabricante y el ADN se secuenció utilizando los cebadores M13 Rev y M13 Uni (Eurofins Genomics) específicos de vectores.

El análisis filogenético de las secuencias reveló que la secuencia de Rma5 se agrupaba con otras subunidades alfa 5 de insectos (no dípteros) y que tenía una identidad por encima del 70 % con nAChR $\alpha 5$ de *Ixodes scapularis*, véase la figura 1. La secuencia de Rma6 tiene una identidad de aproximadamente 60 % con otras subunidades alfa 6 de insectos y una identidad de 86 % con nAChR $\alpha 6$ (subunidad $\alpha 6$ del nAChR) de *I. scapularis*.

Además, después de la clonación y secuenciación de diversas muestras de ARN de *R. microplus*, han identificado dos variantes de corte y empalme alternativas para el exón 3 de la subunidad alfa6 del nAChR.

Resultados del aislamiento y clonación de Rma5 y Rma6

El transcriptoma de la garrapata del ganado bovino se ha secuenciado para determinar la secuencia de diversos canales iónicos neuronales, incluidos los nAChR. En este estudio, el ensamblaje ha producido un número de 250 000 cóntigos de una longitud promedio de 950 pb. La búsqueda por BLAST de la base de datos generada usando secuencias de nAChR de insectos (*nAChR $\alpha 1$ de Anopheles gambiae*, *nAChR $\alpha 2$ de Anopheles gambiae*, *nAChR $\alpha 5$ de Bombyx mori*) ha extraído diversos cóntigos que codifican el nAChR que incluían una secuencia de tipo alfa5 de longitud completa y una secuencia de tipo alfa6parcial. Después de la amplificación por RACE del extremo 3' de la secuencia de tipo alfa6 y del ensamblaje de un cóntigo completo, las transcripciones, tanto de tipo alfa5 como de tipo alfa6, se amplificaron y clonaron en pCR4-TOPO. La traducción de la secuencia de nucleótidos reveló un marco de lectura abierto de 552 aminoácidos y 501 aminoácidos para alfa5 y alfa6, respectivamente.

Expresión heteróloga y registro electrofisiológico en ovocitos de *Xenopus*

Los plásmidos que contenían las secuencias de elección, se linealizaron usando la enzima de restricción BcuI (SpeI) FastDigest (ThermoFisher) durante 30 minutos a 37° C, y para verificar la linealización completa se procesó una parte alícuota en un gel de agarosa. El ADN plasmídico se purificó con fenol:cloroformo y se precipitó con etanol. El sedimento se resuspendió en agua desionizada. El ARN protegido se sintetizó utilizando el kit mMessage mMachine T7 a partir de 1 μ g de ADN plasmídico linealizado, la muestra se purificó con fenol: cloroformo y se precipitó con isopropanol. El sedimento se resuspendió en agua desionizada a una concentración de 500 ng/ μ l, su integridad se analizó en un gel de agarosa y se conservó a -80° C hasta su uso posterior.

Los ovocitos de *Xenopus laevis* se adquirieron como ovarios enteros en el European Xenopus Resource Centre (Universidad de Portsmouth), se suministraron en menos de 24 h en solución salina modificada de Barth (MBS, *Modified Barth's Saline*) en hielo. Después de recibirlos, los ovocitos se trataron con 2 mg/ml de colagenasa de tipo I (Sigma-Aldrich) en solución de Barth sin calcio (NaCl 88 mM, Tris-HCl 15 mM, NaHCO₃ 2.4 mM, MgCl₂ 0.82 mM, KCl 1 mM, pH 7.5) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los ovocitos separados se aclararon cuidadosamente en solución de Barth sin calcio, se desfolicularon manualmente y con un microinyector Drummond recibieron una inyección de 25 ng/ovocito de ARN protegido. Los ovocitos se incubaron a 18° C en solución de Barth que contenía calcio (77 mM) complementada con 4 μ g/ml de kanamicina, 50 μ g/ml de tetraciclina, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina. Después de 3-5 días, se realizaron registros de fijación de voltaje de dos electrodos usando un fijador de ovocitos OC-725C (instrumentos Warner) con el potencial de membrana fijado a -60mV. Los ovocitos se perfundieron continuamente con solución de Ringer de rana (NaCl 115 mM, KCl 2.5 mM, CaCl₂ 1.8 mM y HEPES 10 mM) y las diluciones de ligandos preparadas en solución salina de Ringer se aplicaron usando un sistema de perfusión multiválvula VC-8 (Warner Instruments). Después de la aplicación del ligando, se midió la corriente necesaria para mantener el potencial de membrana a -60 mV y se usó para el análisis de datos posterior.

Bioinformática y procesamiento de datos

Los datos de secuenciación del transcriptoma se recortaron para eliminar los cebadores usando FastQC, se normalizaron digitalmente para reducir la abundancia de las transcripciones más comunes y se ensamblaron con el programa informático Trinity. Los cóntigos se cargaron en un servidor local DeCypher (Active Motif, CA, Estados Unidos) y se investigaron utilizando el algoritmo Terra-BLAST con sondas específicas de secuencia.

La alineación de secuencias, el diseño de cebadores nucleotídicos y la relación filogenética de las subunidades del nAChR, se realizaron utilizando Genious® (Biomatters Ltd.).

La adquisición de datos de electrofisiología de fijación de voltaje de dos electrodos, se realizó utilizando el programa informático LabScribe (iWorks Systems) y los datos se transfirieron a GraphPad Prism (programa informático GraphPad) para el análisis de trazados y el ajuste de la curva de respuesta a la dosis.

Caracterización de homopentámeros de Rma5

- 5 En las figuras 11A y B, se muestran respuestas representativas a acetilcolina (ACh) y a espinosad. Las respuestas a la aplicación de ACh son relativamente pequeñas y no desensibilizantes, mientras que las respuestas a la aplicación de espinosad son grandes y también no desensibilizantes. Espinosad activa al receptor lentamente, mostrándose los primeros signos de despolarización después de aproximadamente 15 seg de perfusión y las mesetas de respuesta después de aproximadamente 30 seg de aplicación. En la figura 10 se muestran las curvas de respuesta a la dosis de la ACh y el espinosad. Espinosad activa al receptor de Rma5 con mayor eficacia que la ACh, siendo la CE_{50} ($9,39 \pm 0,87 \mu\text{M}$) del espinosad más de 10 veces menor que la CE_{50} ($108 \pm 27 \mu\text{M}$) de la ACh.

Caracterización de homopentámeros de Rma6

- 15 Los homopentámeros de Rma6 expresados en ovocitos de *Xenopus* respondían a la exposición a ACh con corrientes internas de desensibilización grandes y rápidas. La CE_{50} calculada a partir de una curva de respuesta a la dosis era de $1,97 \pm 1,2 \mu\text{M}$ (figura 5). Espinosad no activa directamente al receptor de Rma6 pero parece actuar como un modulador alostérico, afectando la tasa de desensibilización del receptor. Como se observa en las figuras 14A y B, después de una aplicación previa de espinosad durante 15 seg, seguido de una aplicación conjunta de ACh durante 3 seg, la tasa de desensibilización de respuestas posteriores a la ACh se vio afectada por espinosad de una manera de respuesta a la dosis (CE_{50} provisional = $5,1 \mu\text{M}$).
- 20 Imidacloprid, es un agonista parcial de homopentámeros de Rma6, que produce respuestas no desensibilizantes y pequeñas después de una aplicación de 5 seg (figuras 12A y B).

Conclusión

- 25 En resumen, cuando las subunidades nAChR α 5 (Rma5) y nAChR α 6 (Rma6), aisladas de la garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus microplus*, se inyectan en ovocitos de *Xenopus*, forman homopentámeros funcionales. La ACh activa a ambos receptores con alta eficacia para Rma6 ($CE_{50} = 1,97 \pm 1,2 \mu\text{M}$) y con una eficacia mucho más baja para Rma5 ($CE_{50} = 108 \pm 27 \mu\text{M}$). Espinosad actúa como un agonista en receptores de Rma5 ($CE_{50} = 9,39 \pm 0,87 \mu\text{M}$) y como un modulador alostérico de tipo II en receptores de Rma6 (CE_{50} provisional = $5,1 \mu\text{M}$). Imidacloprid es un agonista parcial en receptores de Rma6, produciendo respuestas no desensibilizantes.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Bayer Animal Health GmbH
- <120> RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA DE *RHIPICEPHALUS* Y PLAGUICIDA QUE ACTÚA SOBRE EL MISMO
- <130> BHC168004
- <160> 21
- 35 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 1770
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> ADNc basado en *Rhipicephalus microplus*
- <400> 1

ES 2 796 379 T3

acctccacca tgtttcttcg gggactgatt ccagccatcg tgtacgtgtg cctgtggacg 60
 gcctgcctcc tctccacaaa cctcgtggcc gaggtggacg agacgtggtc ggctcgcgag 120
 aacgactcct cgtcgcgcc gccgcccca ctgagtcacg agaagcggct gatggactcg 180
 ctgctgcgcc actacgacgc cagcgtgagg cccgtcaaga actcctcga gcccgatc 240
 attcggctgg gcatcacgct cacgcagata ttgcacctgg acgagaagaa tcaagtcta 300
 acaaccatcg tttggcttga ccaggaatgg ttgcacgagt acctcacttg ggacccgttg 360
 gagtttgaa acttcagcaa cctcaggctg ccctgccaca agatttggct gcctgacatc 420
 gttctctaca acaacgcgga cgactacacg cggggctact tccagacgcg cgccatgatc 480
 gacccccagg gccgagtgtt ctggccgcca cccaccaagt ttcgcagcac ctgcccggtg 540
 gacgtaacgt acttcccttt cgacgaccag gtctgcacaa tgaagttcgg ttcttggatc 600
 tatgacgggc tacaagtgga catccagaac cggacatccg aggttgacct ggtcaattac 660
 atgccaacg gcgagtggga gctgcttgag gcacgcacatg tgcgcaacgt ggtctactac 720
 ccttgctgtc cagaccagcc gttcccggac atcacctggg tcttggatcat gaggcgcaag 780
 acgctctact acatgtacaa cgtggtcctg ccctgcatca tgatgtctgt gctgactctg 840
 ctcgtcttct gcctaccgcc ggactcgggc gagaagatcg cgctcggcgt cacagtgtg 900
 ctagcattct cctgtttcat gctggccata gcggagaaga tgcccagac atcggagtcc 960
 atacccttac tgggaatata cctgacggcc gtgatggcca tcacgtccat ctcggtcgtc 1020
 atgaccgtga tctcctcaa cttccactac cgcggcccca gccgaaaga agtgccagcg 1080
 tggctccgcc gtctcctgct caacaagtca tcctccagtc gtggttgggt ctccaagccg 1140
 gcgcgccgca agaccgtcgg cgacaatcac gtgcacttct acgacttgc atcgcgcaca 1200
 gcagcctcca aggaccgctc agacctggac gacgacgtag acggcagcag aagacctgcg 1260

 gccgacgaca ccttccggct cgtcgtggac agcgtcgtga tcggcagcga agaccgctac 1320
 actcgcggcg agtacgccga gcactccgcg agcaacgagt ccccagatcc cgtcctccac 1380
 ggcgacatgt cgcggaacaa tgcctccggg tcggccaggc accgccgctg tcgcgctgg 1440
 gccgctagtg gcggatccac taagcgcgtg caggaagaag tgctgcggac tttgcggtac 1500
 ctgatggaga aacagcagcg cgaggagcac ctccccgga ctgtgaacga gtggagacag 1560
 atggctctcg tgatagatcg caccttgttc tggttctttc tgatcatcac agccgtgtca 1620
 tcrtctgct tcctagtcgt cataccata cagaggcggg gactgtgact gtgacttggg 1680
 cggagtgtg agcaactctg cattgccatg acgtgctaaa aacttaag agagaggcag 1740
 acgggagaga tccgagggat tcatgtgtca 1770

<210> 2
 <211> 552
 <212> PRT
 <213> *Rhipicephalus microplus*

ES 2 796 379 T3

<400> 2

Met Phe Leu Arg Gly Leu Ile Pro Ala Ile Val Tyr Val Cys Leu Trp
 1 5 10 15

Thr Ala Cys Leu Leu Ser Thr Asn Leu Val Ala Glu Val Asp Glu Thr
 20 25 30

Trp Ser Ala Arg Glu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Pro Pro Pro Leu
 35 40 45

Ser His Glu Lys Arg Leu Met Asp Ser Leu Leu Arg His Tyr Asp Ala
 50 55 60

Ser Val Arg Pro Val Lys Asn Ser Ser Glu Pro Val Ile Ile Arg Leu
 65 70 75 80

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

Leu Thr Thr Ile Val Trp Leu Asp Gln Glu Trp Phe Asp Glu Tyr Leu
 100 105 110

Thr Trp Asp Pro Leu Glu Phe Gly Asn Phe Ser Asn Leu Arg Leu Pro
 115 120 125

Cys His Lys Ile Trp Leu Pro Asp Ile Val Leu Tyr Asn Asn Ala Asp
 130 135 140

ES 2 796 379 T3

Asp Tyr Thr Arg Gly Tyr Phe Gln Thr Arg Ala Met Ile Asp Pro Gln
 145 150 155 160

Gly Arg Val Phe Trp Pro Pro Pro Thr Lys Phe Arg Ser Thr Cys Pro
 165 170 175

Val Asp Val Thr Tyr Phe Pro Phe Asp Asp Gln Val Cys Thr Met Lys
 180 185 190

Phe Gly Ser Trp Ile Tyr Asp Gly Leu Gln Val Asp Ile Gln Asn Arg
 195 200 205

Thr Ser Glu Val Asp Leu Val Asn Tyr Met Pro Asn Gly Glu Trp Glu
 210 215 220

Leu Leu Glu Ala Arg Met Val Arg Asn Val Val Tyr Tyr Pro Cys Cys
 225 230 235 240

Pro Asp Gln Pro Phe Pro Asp Ile Thr Val Val Leu Val Met Arg Arg
 245 250 255

Lys Thr Leu Tyr Tyr Met Tyr Asn Val Val Leu Pro Cys Ile Met Met
 260 265 270

Ser Val Leu Thr Leu Leu Val Phe Cys Leu Pro Pro Asp Ser Gly Glu
 275 280 285

Lys Ile Ala Leu Gly Val Thr Val Leu Leu Ala Phe Ser Val Phe Met
 290 295 300

Leu Ala Ile Ala Glu Lys Met Pro Glu Thr Ser Glu Ser Ile Pro Leu
 305 310 315 320

Leu Gly Ile Tyr Leu Thr Ala Val Met Ala Ile Thr Ser Ile Ser Val
 325 330 335

Val Met Thr Val Ile Val Leu Asn Phe His Tyr Arg Gly Pro Ser Arg
 340 345 350

Lys Glu Val Pro Ala Trp Leu Arg Arg Leu Leu Leu Asn Lys Ser Ser
 355 360 365

Ser Ser Arg Gly Trp Phe Ser Lys Pro Ala Arg Arg Lys Thr Val Gly
 370 375 380

Asp Asn His Val His Phe Tyr Asp Leu Pro Ser Arg Thr Ala Ala Ser
 385 390 395 400

ES 2 796 379 T3

Lys Asp Arg Ser Asp Leu Asp Asp Asp Val Asp Gly Ser Arg Arg Pro
 405 410 415

Ala Ala Asp Asp Thr Phe Arg Leu Val Val Asp Ser Val Val Ile Gly
 420 425 430

Ser Glu Asp Arg Tyr Thr Arg Gly Glu Tyr Ala Glu His Ser Ala Ser
 435 440 445

Asn Glu Ser Pro Ser Pro Val Leu His Gly Asp Met Ser Arg Asn Asn
 450 455 460

Ala Ser Gly Ser Ala Arg His Arg Arg Cys Arg Ala Gly Ala Ala Ser
 465 470 475 480

Gly Gly Ser Thr Lys Arg Val Gln Glu Glu Val Leu Arg Thr Leu Arg
 485 490 495

Tyr Leu Met Glu Lys Gln Gln Arg Glu Glu His Leu Thr Arg Thr Val
 500 505 510

Asn Glu Trp Arg Gln Met Ala Leu Val Ile Asp Arg Thr Leu Phe Trp
 515 520 525

Phe Phe Leu Ile Ile Thr Ala Val Ser Ser Val Cys Phe Leu Val Val
 530 535 540

Ile Pro Ile Gln Arg Arg Gly Leu
 545 550

- <210> 3
- <211> 1535
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

5

- <220>
- <223> ADNc basado en *Rhipicephalus microplus*
- <400> 3

ES 2 796 379 T3

accacgacgc ggaccatgcg ccccgacgc ctgtctgtgc cgctgcagct aggcttctgc 60
 gccaacctgc tgtggatcgc cgtgctgctc accgcgcctc aggactctga acaaggcgcg 120
 cacgagcggc ggcttctggc agacctgctg gccaaactaca acaccctgga gcggcccgtg 180
 ctcaacgagt cggagccgct catcctcagc ttcgggctca cactgcagca gatcatagac 240
 gtcgacgaaa agaatcagct aattattaca aatatctggt taacattgga ttggatagat 300
 gtgaatctac gttggaacct aaaagactac ggcggagtgc aggacctgcg tattccgcca 360
 aacaaaattt ggaagcctga cgtgctcatg tacaacagcg cggacgaaaa gttcgcggc 420

 acgtaccoga ccaacgtggt cgtgcggagc aacggcagtt gcaactacat ccctcctggc 480
 atctttaaga gcacgtgcaa gatcgacatt acgtggttcc cttttgacga tcagaagtgc 540
 gacctgaagt tcggctcctg gacctatcac ggttatcagc tggaccttcg tgtcaacagt 600
 gaggaaggcg gggatctgac tacctacatt cccaatggcg agtgggacct gataggcgtg 660
 ccgggagtgc gcaacgttcg cgagtatgcc tgctgtccgg agccgtacat cgacatcacg 720
 tacaccatcc acatccggcg gcgcacgctc tactacggct tcaacctcat cattccctgc 780
 gtgctcatct cgtccatgac tctgctcggc ttcacgctgc cccccgacac cggagagagg 840
 ctcaccctgg gtgtaacat tttgctgtcc ctgacggtat tcatgctcca gctcgccgag 900
 accatgcctc cgacgtccga tgctgtctcc ataataggaa cttattttgc ctgcatcatg 960
 atcatggttg ccttttcggc ggtcatgacc gtggtggtcc tgaactatca tcacagaaat 1020
 caagagacga ccgaaatgcc tgctttgatt cgcacggtgt tcctggtgtg gctcccgtgg 1080
 cttctgcgca tggagcctcc gggccagaag gcgaacaggc gcagcctctt cctcaacagc 1140
 aagatgaaag agctcgagct gaaggagcgc tcatcgcgga gtctgctggc caacgtgctg 1200
 gacatcgacg acgacttccg cacggccaac agcgcgcccg ccgcccgcga ctgccacggg 1260
 tctcggacct cgttcctggg cgggtggcggc ggggcgtcca cggtgacgc ttgctccac 1320
 tcgtcgcgtg aactgaactt gatcttgccg gagctgcgct tcatcacgag ccgcatgccc 1380
 aaggacgagc aagagcggga ggtcgttggc gagtggaagt tcgcggccat ggtcgtcgac 1440
 cgctgctgcc tcatcatctt ctccctgttc accatcatct ccacctgccc ctgcctcttc 1500
 tcggcgcccc atctggtcgc ctagcgcacc ctgct 1535

<210> 4
 <211> 502
 <212> PRT
 <213> *Rhipicephalus microplus*
 <400> 4

ES 2 796 379 T3

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

Asn Leu Leu Trp Ile Ala Val Leu Leu Thr Ala Pro Gln Asp Ser Glu
20 25 30

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

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

ES 2 796 379 T3

Ser Phe Gly Leu Thr Leu Gln Gln Ile Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn
65 70 75 80

Gln Leu Ile Ile Thr Asn Ile Trp Leu Thr Leu Asp Trp Ile Asp Val
85 90 95

Asn Leu Arg Trp Asn Pro Lys Asp Tyr Gly Gly Val Gln Asp Leu Arg
100 105 110

Ile Pro Pro Asn Lys Ile Trp Lys Pro Asp Val Leu Met Tyr Asn Ser
115 120 125

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

Ser Asn Gly Ser Cys Asn Tyr Ile Pro Pro Gly Ile Phe Lys Ser Thr
145 150 155 160

Cys Lys Ile Asp Ile Thr Trp Phe Pro Phe Asp Asp Gln Lys Cys Asp
165 170 175

Leu Lys Phe Gly Ser Trp Thr Tyr His Gly Tyr Gln Leu Asp Leu Arg
180 185 190

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

Glu Trp Asp Leu Ile Gly Val Pro Gly Val Arg Asn Val Arg Glu Tyr
210 215 220

Ala Cys Cys Pro Glu Pro Tyr Ile Asp Ile Thr Tyr Thr Ile His Ile
225 230 235 240

Arg Arg Arg Thr Leu Tyr Tyr Gly Phe Asn Leu Ile Ile Pro Cys Val
245 250 255

Leu Ile Ser Ser Met Thr Leu Leu Gly Phe Thr Leu Pro Pro Asp Thr
260 265 270

Gly Glu Arg Leu Thr Leu Gly Val Thr Ile Leu Leu Ser Leu Thr Val
275 280 285

Phe Met Leu Gln Leu Ala Glu Thr Met Pro Pro Thr Ser Asp Ala Val
290 295 300

Ser Ile Ile Gly Thr Tyr Phe Ala Cys Ile Met Ile Met Val Ala Phe
305 310 315 320

ES 2 796 379 T3

Ser Val Val Met Thr Val Val Val Leu Asn Tyr His His Arg Asn Gln
 325 330 335

Glu Thr Thr Glu Met Pro Ala Leu Ile Arg Thr Val Phe Leu Val Trp
 340 345 350

Leu Pro Trp Leu Leu Arg Met Glu Pro Pro Gly Gln Lys Ala Asn Arg
 355 360 365

Arg Ser Leu Phe Leu Asn Ser Lys Met Lys Glu Leu Glu Leu Lys Glu
 370 375 380

Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu Ala Asn Val Leu Asp Ile Asp Asp Asp
 385 390 395 400

Phe Arg Thr Ala Asn Ser Ala Ala Ala Ala Ala Asp Cys His Gly Ser
 405 410 415

Arg Thr Pro Phe Leu Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ser Thr Val His Ala
 420 425 430

Cys Val His Ser Ser Arg Glu Leu Asn Leu Ile Leu Arg Glu Leu Arg
 435 440 445

Phe Ile Thr Ser Arg Met Arg Lys Asp Glu Gln Glu Arg Glu Val Val
 450 455 460

Gly Glu Trp Lys Phe Ala Ala Met Val Val Asp Arg Cys Cys Leu Ile
 465 470 475 480

Ile Phe Ser Leu Phe Thr Ile Ile Ser Thr Cys Ala Cys Leu Phe Ser
 485 490 495

Ala Pro His Leu Val Ala
 500

- 5
- <210> 5
 - <211> 1535
 - <212> ADN
 - <213> secuencia artificial
 - <220>
 - <223> ADNc basado en *Rhipicephalus microplus*
 - <400> 5

ES 2 796 379 T3

accacgacgc ggaccatgcg ccccgacgc ctgtctgtgc cgctgcagct aggcttctgc 60
 gccaacctgc tgtggatcgc cgtgctgctc accgcgcctc aggactctga acaaggcgcg 120
 cacgagcggc ggcttctggc agacctgctg gccaaactaca acaccctgga gcggcccgtg 180

 ctcaacgagt cggagccgct catcctcagc ttcgggctca cactgcagca gatcatagac 240
 gtcgacgaaa agaatacaat aataacaaca aacgtgtggt taaatctgga ttggatagat 300
 gtgaatctac gttggaacc aaaagactac ggcggagtgc aggacctgcg tattccgcca 360
 aacaaaattt ggaagcctga cgtgctcatg tacaacagcg cggacgaaaa gttcgacggc 420
 acgtacccga ccaacgtggt cgtgctgagc aacggcagtt gcaactacat ccctcctggc 480
 atctttaaga gcacgtgcaa gatcgacatt acgtggttcc cttttgacga tcagaagtgc 540
 gacctgaagt tcggctcctg gacctatcac ggttatcagc tggaccttcg tgtcaacagt 600
 gaggaaggcg gggatctgac tacctacatt cccaatggcg agtgggacct gataggcgtg 660
 ccgggagtgc gcaacgttcg cgagtatgcc tgctgtccgg agccgtacat cgacatcacg 720
 tacaccatcc acatccggcg gcgcacgctc tactacggct tcaacctcat cattccctgc 780
 gtgctcatct cgtccatgac tctgctcggc ttcacgctgc cccccgacac cggagagagg 840
 ctcaccctgg gtgtaacat tttgctgtcc ctgacggtat tcatgctcca gctcgccgag 900
 accatgcctc cgacgtccga tgctgtctcc ataataggaa cttattttgc ctgcatcatg 960
 atcatggttg cttttcggc ggtcatgacc gtggtggtcc tgaactatca tcacagaaat 1020
 caagagacga ccgaaatgcc tgctttgatt cgcacggtgt tcctgggtgtg gctcccgtgg 1080
 cttctgcgca tggagcctcc gggccagaag gcgaacagge gcagcctctt cctcaacagc 1140
 aagatgaaag agctcgagct gaaggagcgc tcatcgcgga gtctgctggc caacgtgctg 1200
 gacatcgacg acgacttccg cacggccaac agcgcgcccg ccgcccgcga ctgccacggg 1260
 tctcggaccc cgttcctggg cggtggcggc ggggcgtcca cgggtgcacgc ttgcgtccac 1320
 tcgtcgcgtg aactgaactt gatcttgcgc gagctgcgct tcatcacgag ccgcatgcgc 1380
 aaggacgagc aagagcggga ggtcgttggc gagtgggaagt tcgcccgcct ggtcgtcgac 1440
 cgctgctgcc tcatcatctt ctccctgttc accatcatct ccacctgcgc ctgcctcttc 1500
 tcggcgcccc atctggtcgc ctagcgcacc ctgct 1535

<210> 6
 <211> 502
 <212> PRT
 <213> *Rhipicephalus microplus*
 <400> 6

5

ES 2 796 379 T3

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

Asn Leu Leu Trp Ile Ala Val Leu Leu Thr Ala Pro Gln Asp Ser Glu
20 25 30

ES 2 796 379 T3

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

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

Ser Phe Gly Leu Thr Leu Gln Gln Ile Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn
65 70 75 80

Gln Ile Ile Thr Thr Asn Val Trp Leu Asn Leu Asp Trp Ile Asp Val
85 90 95

Asn Leu Arg Trp Asn Pro Lys Asp Tyr Gly Gly Val Gln Asp Leu Arg
100 105 110

Ile Pro Pro Asn Lys Ile Trp Lys Pro Asp Val Leu Met Tyr Asn Ser
115 120 125

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

Ser Asn Gly Ser Cys Asn Tyr Ile Pro Pro Gly Ile Phe Lys Ser Thr
145 150 155 160

Cys Lys Ile Asp Ile Thr Trp Phe Pro Phe Asp Asp Gln Lys Cys Asp
165 170 175

Leu Lys Phe Gly Ser Trp Thr Tyr His Gly Tyr Gln Leu Asp Leu Arg
180 185 190

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

Glu Trp Asp Leu Ile Gly Val Pro Gly Val Arg Asn Val Arg Glu Tyr
210 215 220

Ala Cys Cys Pro Glu Pro Tyr Ile Asp Ile Thr Tyr Thr Ile His Ile
225 230 235 240

Arg Arg Arg Thr Leu Tyr Tyr Gly Phe Asn Leu Ile Ile Pro Cys Val
245 250 255

Leu Ile Ser Ser Met Thr Leu Leu Gly Phe Thr Leu Pro Pro Asp Thr
260 265 270

Gly Glu Arg Leu Thr Leu Gly Val Thr Ile Leu Leu Ser Leu Thr Val
275 280 285

ES 2 796 379 T3

Phe Met Leu Gln Leu Ala Glu Thr Met Pro Pro Thr Ser Asp Ala Val
 290 295 300

Ser Ile Ile Gly Thr Tyr Phe Ala Cys Ile Met Ile Met Val Ala Phe
 305 310 315 320

Ser Val Val Met Thr Val Val Val Leu Asn Tyr His His Arg Asn Gln
 325 330 335

Glu Thr Thr Glu Met Pro Ala Leu Ile Arg Thr Val Phe Leu Val Trp
 340 345 350

Leu Pro Trp Leu Leu Arg Met Glu Pro Pro Gly Gln Lys Ala Asn Arg
 355 360 365

Arg Ser Leu Phe Leu Asn Ser Lys Met Lys Glu Leu Glu Leu Lys Glu
 370 375 380

Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu Ala Asn Val Leu Asp Ile Asp Asp Asp
 385 390 395 400

Phe Arg Thr Ala Asn Ser Ala Ala Ala Ala Ala Asp Cys His Gly Ser
 405 410 415

Arg Thr Pro Phe Leu Gly Gly Gly Gly Ala Ser Thr Val His Ala
 420 425 430

Cys Val His Ser Ser Arg Glu Leu Asn Leu Ile Leu Arg Glu Leu Arg
 435 440 445

Phe Ile Thr Ser Arg Met Arg Lys Asp Glu Gln Glu Arg Glu Val Val
 450 455 460

Gly Glu Trp Lys Phe Ala Ala Met Val Val Asp Arg Cys Cys Leu Ile
 465 470 475 480

Ile Phe Ser Leu Phe Thr Ile Ile Ser Thr Cys Ala Cys Leu Phe Ser
 485 490 495

Ala Pro His Leu Val Ala
 500

<210> 7

<211> 1653

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> parte de ADNc basada en *Rhipicephalus microplus*

<400> 7

ES 2 796 379 T3

tttcttcggg gactgattcc agccatcgtg tacgtgtgcc tgtggacggc ctgcctcctc 60
 tccacaaacc tcgtggccga ggtggacgag acgtggtcgg ctgcgagaaa cgactcctcg 120
 tcgccgccgc cgccgccact gagtacgag aagcggctga tggactcgct gctgcgccac 180
 tacgacgcca gcgtgaggcc cgtcaagaac tcctcggagc ccgtcatcat tcggctgggc 240
 atcacgctca cgagatatt cgacctggac gagaagaatc aagtcctaac aaccatcgtt 300
 tggcttgacc aggaatggtt cgacgagtac ctacttggg acccgttggg gtttgaaac 360
 ttcagcaacc tcaggctgcc ctgccacaag atttggctgc ctgacatcgt tctctacaac 420
 aacgcggacg actacacgcg gggctacttc cagacgcgcg ccatgatcga ccccagggc 480
 cgagtgttct ggccgccacc caccaagttt cgcagcacct gcccggtgga cgtaacgtac 540
 ttccctttcg acgaccaggt ctgcacaatg aagttcgggtt cttggatcta tgacgggcta 600
 caagtggaca tccagaaccg gacatccgag gttgacctgg tcaattacat gcccaacggc 660
 gagtgggagc tgcttgaggc acgcatggtg cgcaacgtgg tctactacc ttgctgtcca 720
 gaccagccgt tcccggacat caccgtggtc ttggtcatga ggcgcaagac gctctactac 780
 atgtacaacg tggctctgcc ctgcatcatg atgtctgtgc tgactctgct cgtcttctgc 840
 ctaccgccgg actcgggcca gaagatcgcg ctcggcgtca cagtgtctgct agcattctcc 900
 gtgttcatgc tggccatagc ggagaagatg cccgagacat cggagtccat acccttactg 960
 ggaatatacc tgacggccgt gatggccatc acgtccatct cggtcgtcat gaccgtgatc 1020
 gtcctcaact tccactaccg cggccccagc cggaaagaag tgccagcgtg gctccgccgt 1080
 ctctctca acaagtcac ctccagtcgt ggttgggttct cgaagccggc gcgccgcaag 1140
 accgtcggcg acaatcacgt gacttctac gacttgccat cgcgcacagc agcctccaag 1200
 gaccgctcag acctggacga cgacgtagac ggcagcagaa gacctgcggc cgacgacacc 1260
 ttccggctcg tcgtggacag cgtcgtgatc ggcagcgaag accgctacac tcgccggcag 1320
 tacgccgagc actccgcgag caacgagtcc ccgagtcccg tcctccacgg cgacatgtcg 1380
 cggacaatg cctccgggtc ggccaggcac cgccgctgtc gcgctggtgc cgctagtggc 1440
 ggatccacta agcgcgtgca ggaagaagtg ctgcggactt tgccgtacct gatggagaaa 1500
 cagcagcgcg aggagcacct caccggact gtgaacgagt ggagacagat ggctctcgtg 1560
 atagatcgca ccttgttctg gttctttctg atcatcacag ccgtgtcatc crtctgcttc 1620
 ctagtctca taccataca gaggcgggga ctg 1653

<210> 8
 <211> 1503
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> parte de ADNc basada en *Rhipicephalus microplus*
 <400> 8

ES 2 796 379 T3

cgccccggac gcctgtctgt gccgctgcag ctaggcttct gcgccaacct gctgtggatc 60
gccgtgctgc tcaccgcgcc tcaggactct gaacaaggcg cgcacgagcg gcggttctg 120
gcagacctgc tggccaacta caacacctg gagcggcccg tgctcaacga gtcggagccg 180
ctcatcctca gttcgggct cactctgcag cagatcatag acgtcgacga aaagaatcag 240
ctaattatta caaatatctg gttaacattg gattggatag atgtgaatct acgttggaac 300
ccaaaagact acggcggagt gcaggacctg cgtattccgc caaacaaaat ttggaagcct 360
gacgtgctca tgtacaacag cgcggacgaa aagttcgacg gcacgtaccg gaccaacgtg 420
gtcgtgcgga gcaacggcag ttgcaactac atccctcctg gcatctttaa gagcacgtgc 480
aagatcgaca ttacgtggtt cccttttgac gatcagaagt gcgacctgaa gttcggctcc 540
tggacctatc acggttatca gctggacctt cgtgtcaaca gtgaggaagg cggggatctg 600
actacctaca ttcccaatgg cgagtgggac ctgataggcg tgccgggagt gcgcaacggt 660
cgcgagtatg cctgctgtcc ggagccgtac atcgacatca cgtacaccat ccacatccgg 720
cggcgcacgc tctactacgg cttcaacctc atcattccct gcgtgctcat ctcgtccatg 780
actctgctcg gtttcacgct gcccccgac accggagaga ggctcacctt ggggtgaacc 840
atthtctgtt ccctgacggt attcatgctc cagctcgccg agaccatgcc tccgacgtcc 900
gatgctgtct ccataatagg aacttatttt gcctgcatca tgatcatggt tgcttttctg 960
gtggtcatga ccgtggtggt cctgaaactat catcacagaa atcaagagac gaccgaaatg 1020
cctgctttga ttcgcacggt gttcctggtg tggctcccgt ggcttctgcg catggagcct 1080
ccgggccaga aggcgaacag gcgcagcctc ttctcaaca gcaagatgaa agagctcgag 1140
ctgaaggagc gctcatcgcg gactctgctg gccaacgtgc tggacatcga cgacgacttc 1200
cgcacggcca acagcgcgcg cgcgcgccgc gactgccacg ggtctcggac cccgttctg 1260
ggcggtgccg gcggggcgtc cacggtgcac gcttgcgtcc actcgtcgcg tgaactgaac 1320
ttgatcttgc gcgagctgcg cttcatcacg agccgcatgc gcaaggacga gcaagagcgg 1380
gaggtcgttg gcgagtggaa gttcgcggcc atggtcgtcg accgctgctg cctcatcatc 1440
ttctccctgt tcaccatcat ctccacctgc gcctgcctct tctcggcgcc ccacatggtc 1500
gcc 1503

<210> 9
<211> 1503
<212> ADN
<213> secuencia artificial

5

<220>
<223> parte de ADNc basada en *Rhipicephalus microplus*

<400> 9

ES 2 796 379 T3

cgccccggac gcctgtctgt gccgctgcag ctaggcttct gcgccaacct gctgtggatc 60
gccgtgctgc tcaccgcgcc tcaggactct gaacaaggcg cgcacgagcg gcggcttctg 120
gcagacctgc tggccaacta caacaccctg gagcggcccg tgctcaacga gtcggagccg 180
ctcatcctca gcttcgggct cactctgcag cagatcatag acgtcgacga aaagaatcaa 240
ataataacaa caaacgtgtg gttaaactct gattggatag atgtgaatct acgttggaac 300
ccaaaagact acggcggagt gcaggacctg cgtattccgc caaacaaaat ttggaagcct 360
gacgtgctca tgtacaacag cgcggacgaa aagttcgacg gcacgtaccg gaccaacgtg 420
gtcgtgcgga gcaacggcag ttgcaactac atccctcctg gcatctttaa gagcacgtgc 480
aagatcgaca ttacgtgggt cccttttgac gatcagaagt gcgacctgaa gttcggctcc 540
tggacctatc acggttatca gctggacctt cgtgtcaaca gtgaggaagg cggggatctg 600
actacctaca ttoccaatgg cgagtgggac ctgataggcg tgccgggagt gcgcaacggt 660
cgcgagtatg cctgctgtcc ggagccgtac atcgacatca cgtacaccat ccacatccgg 720
cggcgcacgc tctactacgg cttcaacctc atcattccct gcgtgctcat ctctgctcatg 780
actctgctcg gtttcacgct gcccccgac accggagaga ggctcacctt ggggtgaacc 840
atthtctgtt ccctgacggt attcatgctc cagctcgccg agaccatgcc tccgacgtcc 900
gatgctgtct ccataatagg aacttatttt gcctgcatca tgatcatggt tgcttttctg 960
gtggtcatga ccgtggtggt cctgaaactat catcacagaa atcaagagac gaccgaaatg 1020
cctgctttga ttcgcacggt gttcctggtg tggctcccgt ggcttctgcg catggagcct 1080
ccgggccaga aggcgaacag gcgcagcctc ttctcaaca gcaagatgaa agagctcgag 1140
ctgaaggagc gctcatcgcg gactctgctg gccaacgtgc tggacatcga cgacgacttc 1200
cgcacggcca acagcgccgc cgcgcgccgc gactgccacg ggtctcggac cccgttctctg 1260
ggcggtgccg gcggggcgtc cacggtgcac gcttgcgtcc actcgtcgcg tgaactgaac 1320
ttgatcttgc gcgagctgcg cttcatcacg agccgcatgc gcaaggacga gcaagagcgg 1380
gaggtcgttg gcgagtggaa gttcgcggcc atggtcgtcg accgctgctg cctcatcatc 1440
ttctccctgt tcaccatcat ctccacctgc gcctgcctct tctcggcgcc ccacatctggtc 1500
gcc 1503

<210> 10
<211> 523
<212> PRT
<213> secuencia artificial

5

<220>
<223> parte de proteína de *Rhipicephalus microplus*

<400> 10

ES 2 796 379 T3

Leu Val Ala Glu Val Asp Glu Thr Trp Ser Ala Arg Glu Asn Asp Ser
 1 5 10 15
 Ser Ser Pro Pro Pro Pro Pro Leu Ser His Glu Lys Arg Leu Met Asp
 20 25 30
 Ser Leu Leu Arg His Tyr Asp Ala Ser Val Arg Pro Val Lys Asn Ser
 35 40 45
 Ser Glu Pro Val Ile Ile Arg Leu Gly Ile Thr Leu Thr Gln Ile Phe
 50 55 60
 Asp Leu Asp Glu Lys Asn Gln Val Leu Thr Thr Ile Val Trp Leu Asp
 65 70 75 80
 Gln Glu Trp Phe Asp Glu Tyr Leu Thr Trp Asp Pro Leu Glu Phe Gly
 85 90 95
 Asn Phe Ser Asn Leu Arg Leu Pro Cys His Lys Ile Trp Leu Pro Asp
 100 105 110
 Ile Val Leu Tyr Asn Asn Ala Asp Asp Tyr Thr Arg Gly Tyr Phe Gln
 115 120 125
 Thr Arg Ala Met Ile Asp Pro Gln Gly Arg Val Phe Trp Pro Pro Pro
 130 135 140
 Thr Lys Phe Arg Ser Thr Cys Pro Val Asp Val Thr Tyr Phe Pro Phe
 145 150 155 160
 Asp Asp Gln Val Cys Thr Met Lys Phe Gly Ser Trp Ile Tyr Asp Gly
 165 170 175
 Leu Gln Val Asp Ile Gln Asn Arg Thr Ser Glu Val Asp Leu Val Asn
 180 185 190
 Tyr Met Pro Asn Gly Glu Trp Glu Leu Leu Glu Ala Arg Met Val Arg
 195 200 205
 Asn Val Val Tyr Tyr Pro Cys Cys Pro Asp Gln Pro Phe Pro Asp Ile
 210 215 220
 Thr Val Val Leu Val Met Arg Arg Lys Thr Leu Tyr Tyr Met Tyr Asn
 225 230 235 240

ES 2 796 379 T3

Val Val Leu Pro Cys Ile Met Met Ser Val Leu Thr Leu Leu Val Phe
245 250 255

Cys Leu Pro Pro Asp Ser Gly Glu Lys Ile Ala Leu Gly Val Thr Val
260 265 270

Leu Leu Ala Phe Ser Val Phe Met Leu Ala Ile Ala Glu Lys Met Pro
275 280 285

Glu Thr Ser Glu Ser Ile Pro Leu Leu Gly Ile Tyr Leu Thr Ala Val
290 295 300

Met Ala Ile Thr Ser Ile Ser Val Val Met Thr Val Ile Val Leu Asn
305 310 315 320

Phe His Tyr Arg Gly Pro Ser Arg Lys Glu Val Pro Ala Trp Leu Arg
325 330 335

Arg Leu Leu Leu Asn Lys Ser Ser Ser Ser Arg Gly Trp Phe Ser Lys
340 345 350

Pro Ala Arg Arg Lys Thr Val Gly Asp Asn His Val His Phe Tyr Asp
355 360 365

Leu Pro Ser Arg Thr Ala Ala Ser Lys Asp Arg Ser Asp Leu Asp Asp
370 375 380

Asp Val Asp Gly Ser Arg Arg Pro Ala Ala Asp Asp Thr Phe Arg Leu
385 390 395 400

Val Val Asp Ser Val Val Ile Gly Ser Glu Asp Arg Tyr Thr Arg Gly
405 410 415

Glu Tyr Ala Glu His Ser Ala Ser Asn Glu Ser Pro Ser Pro Val Leu
420 425 430

His Gly Asp Met Ser Arg Asn Asn Ala Ser Gly Ser Ala Arg His Arg
435 440 445

Arg Cys Arg Ala Gly Ala Ala Ser Gly Gly Ser Thr Lys Arg Val Gln
450 455 460

Glu Glu Val Leu Arg Thr Leu Arg Tyr Leu Met Glu Lys Gln Gln Arg
465 470 475 480

Glu Glu His Leu Thr Arg Thr Val Asn Glu Trp Arg Gln Met Ala Leu

ES 2 796 379 T3

485

490

495

Val Ile Asp Arg Thr Leu Phe Trp Phe Phe Leu Ile Ile Thr Ala Val
500 505 510

Ser Ser Val Cys Phe Leu Val Val Ile Pro Ile
515 520

<210> 11

<211> 374

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> parte de proteína de *Rhipicephalus microplus*

<400> 11

Leu Leu Thr Ala Pro Gln Asp Ser Glu Gln Gly Ala His Glu Arg Arg
1 5 10 15

Leu Leu Ala Asp Leu Leu Ala Asn Tyr Asn Thr Leu Glu Arg Pro Val
20 25 30

Leu Asn Glu Ser Glu Pro Leu Ile Leu Ser Phe Gly Leu Thr Leu Gln
35 40 45

Gln Ile Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Leu Ile Ile Thr Asn Ile
50 55 60

Trp Leu Thr Leu Asp Trp Ile Asp Val Asn Leu Arg Trp Asn Pro Lys
65 70 75 80

Asp Tyr Gly Gly Val Gln Asp Leu Arg Ile Pro Pro Asn Lys Ile Trp
85 90 95

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

Thr Tyr Pro Thr Asn Val Val Val Arg Ser Asn Gly Ser Cys Asn Tyr
115 120 125

Ile Pro Pro Gly Ile Phe Lys Ser Thr Cys Lys Ile Asp Ile Thr Trp
130 135 140

Phe Pro Phe Asp Asp Gln Lys Cys Asp Leu Lys Phe Gly Ser Trp Thr
145 150 155 160

Tyr His Gly Tyr Gln Leu Asp Leu Arg Val Asn Ser Glu Glu Gly Gly
165 170 175

ES 2 796 379 T3

Asp Leu Thr Thr Tyr Ile Pro Asn Gly Glu Trp Asp Leu Ile Gly Val
 180 185 190

Pro Gly Val Arg Asn Val Arg Glu Tyr Ala Cys Cys Pro Glu Pro Tyr
 195 200 205

Ile Asp Ile Thr Tyr Thr Ile His Ile Arg Arg Arg Thr Leu Tyr Tyr
 210 215 220

Gly Phe Asn Leu Ile Ile Pro Cys Val Leu Ile Ser Ser Met Thr Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Phe Thr Leu Pro Pro Asp Thr Gly Glu Arg Leu Thr Leu Gly
 245 250 255

Val Thr Ile Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Met Leu Gln Leu Ala Glu
 260 265 270

Thr Met Pro Pro Thr Ser Asp Ala Val Ser Ile Ile Gly Thr Tyr Phe
 275 280 285

Ala Cys Ile Met Ile Met Val Ala Phe Ser Val Val Met Thr Val Val
 290 295 300

Val Leu Asn Tyr His His Arg Asn Gln Glu Thr Thr Glu Met Pro Ala
 305 310 315 320

Leu Ile Arg Thr Val Phe Leu Val Trp Leu Pro Trp Leu Leu Arg Met
 325 330 335

Glu Pro Pro Gly Gln Lys Ala Asn Arg Arg Ser Leu Phe Leu Asn Ser
 340 345 350

Lys Met Lys Glu Leu Glu Leu Lys Glu Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu
 355 360 365

Ala Asn Val Leu Asp Ile
 370

<210> 12

<211> 378

<212> PRT

<213> secuencia artificial

5

<220>

<223> parte de proteína de *Rhipicephalus microplus*

<400> 12

ES 2 796 379 T3

Ile Ala Val Leu Leu Thr Ala Pro Gln Asp Ser Glu Gln Gly Ala His
1 5 10 15

Glu Arg Arg Leu Leu Ala Asp Leu Leu Ala Asn Tyr Asn Thr Leu Glu
20 25 30

Arg Pro Val Leu Asn Glu Ser Glu Pro Leu Ile Leu Ser Phe Gly Leu
35 40 45

Thr Leu Gln Gln Ile Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Leu Ile Ile
50 55 60

Thr Asn Ile Trp Leu Thr Leu Asp Trp Ile Asp Val Asn Leu Arg Trp
65 70 75 80

Asn Pro Lys Asp Tyr Gly Gly Val Gln Asp Leu Arg Ile Pro Pro Asn
85 90 95

Lys Ile Trp Lys Pro Asp Val Leu Met Tyr Asn Ser Ala Asp Glu Lys
100 105 110

Phe Asp Gly Thr Tyr Pro Thr Asn Val Val Val Arg Ser Asn Gly Ser
115 120 125

Cys Asn Tyr Ile Pro Pro Gly Ile Phe Lys Ser Thr Cys Lys Ile Asp
130 135 140

Ile Thr Trp Phe Pro Phe Asp Asp Gln Lys Cys Asp Leu Lys Phe Gly
145 150 155 160

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

Glu Gly Gly Asp Leu Thr Thr Tyr Ile Pro Asn Gly Glu Trp Asp Leu
180 185 190

Ile Gly Val Pro Gly Val Arg Asn Val Arg Glu Tyr Ala Cys Cys Pro
195 200 205

Glu Pro Tyr Ile Asp Ile Thr Tyr Thr Ile His Ile Arg Arg Arg Thr
210 215 220

Leu Tyr Tyr Gly Phe Asn Leu Ile Ile Pro Cys Val Leu Ile Ser Ser
225 230 235 240

Met Thr Leu Leu Gly Phe Thr Leu Pro Pro Asp Thr Gly Glu Arg Leu
245 250 255

ES 2 796 379 T3

Thr Leu Gly Val Thr Ile Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Met Leu Gln
260 265 270

Leu Ala Glu Thr Met Pro Pro Thr Ser Asp Ala Val Ser Ile Ile Gly
275 280 285

Thr Tyr Phe Ala Cys Ile Met Ile Met Val Ala Phe Ser Val Val Met
290 295 300

Thr Val Val Val Leu Asn Tyr His His Arg Asn Gln Glu Thr Thr Glu
305 310 315 320

Met Pro Ala Leu Ile Arg Thr Val Phe Leu Val Trp Leu Pro Trp Leu
325 330 335

Leu Arg Met Glu Pro Pro Gly Gln Lys Ala Asn Arg Arg Ser Leu Phe
340 345 350

Leu Asn Ser Lys Met Lys Glu Leu Glu Leu Lys Glu Arg Ser Ser Arg
355 360 365

Ser Leu Leu Ala Asn Val Leu Asp Ile Asp
370 375

<210> 13

<211> 374

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> parte de proteína de *Rhipicephalus microplus*

<400> 13

Leu Leu Thr Ala Pro Gln Asp Ser Glu Gln Gly Ala His Glu Arg Arg
1 5 10 15

Leu Leu Ala Asp Leu Leu Ala Asn Tyr Asn Thr Leu Glu Arg Pro Val
20 25 30

Leu Asn Glu Ser Glu Pro Leu Ile Leu Ser Phe Gly Leu Thr Leu Gln
35 40 45

Gln Ile Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Ile Ile Thr Thr Asn Val
50 55 60

Trp Leu Asn Leu Asp Trp Ile Asp Val Asn Leu Arg Trp Asn Pro Lys
65 70 75 80

ES 2 796 379 T3

Asp Tyr Gly Gly Val Gln Asp Leu Arg Ile Pro Pro Asn Lys Ile Trp
 85 90 95
 Lys Pro Asp Val Leu Met Tyr Asn Ser Ala Asp Glu Lys Phe Asp Gly
 100 105 110
 Thr Tyr Pro Thr Asn Val Val Val Arg Ser Asn Gly Ser Cys Asn Tyr
 115 120 125
 Ile Pro Pro Gly Ile Phe Lys Ser Thr Cys Lys Ile Asp Ile Thr Trp
 130 135 140
 Phe Pro Phe Asp Asp Gln Lys Cys Asp Leu Lys Phe Gly Ser Trp Thr
 145 150 155 160
 Tyr His Gly Tyr Gln Leu Asp Leu Arg Val Asn Ser Glu Glu Gly Gly
 165 170 175
 Asp Leu Thr Thr Tyr Ile Pro Asn Gly Glu Trp Asp Leu Ile Gly Val
 180 185 190
 Pro Gly Val Arg Asn Val Arg Glu Tyr Ala Cys Cys Pro Glu Pro Tyr
 195 200 205
 Ile Asp Ile Thr Tyr Thr Ile His Ile Arg Arg Arg Thr Leu Tyr Tyr
 210 215 220
 Gly Phe Asn Leu Ile Ile Pro Cys Val Leu Ile Ser Ser Met Thr Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Phe Thr Leu Pro Pro Asp Thr Gly Glu Arg Leu Thr Leu Gly
 245 250 255
 Val Thr Ile Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Met Leu Gln Leu Ala Glu
 260 265 270
 Thr Met Pro Pro Thr Ser Asp Ala Val Ser Ile Ile Gly Thr Tyr Phe
 275 280 285
 Ala Cys Ile Met Ile Met Val Ala Phe Ser Val Val Met Thr Val Val
 290 295 300
 Val Leu Asn Tyr His His Arg Asn Gln Glu Thr Thr Glu Met Pro Ala
 305 310 315 320
 Leu Ile Arg Thr Val Phe Leu Val Trp Leu Pro Trp Leu Leu Arg Met
 325 330 335

ES 2 796 379 T3

Glu Pro Pro Gly Gln Lys Ala Asn Arg Arg Ser Leu Phe Leu Asn Ser
 340 345 350

Lys Met Lys Glu Leu Glu Leu Lys Glu Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu
 355 360 365

Ala Asn Val Leu Asp Ile
 370

<210> 14
 <211> 378
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> parte de proteína de *Rhipicephalus microplus*

<400> 14
 Ile Ala Val Leu Leu Thr Ala Pro Gln Asp Ser Glu Gln Gly Ala His
 1 5 10 15

Glu Arg Arg Leu Leu Ala Asp Leu Leu Ala Asn Tyr Asn Thr Leu Glu
 20 25 30

Arg Pro Val Leu Asn Glu Ser Glu Pro Leu Ile Leu Ser Phe Gly Leu
 35 40 45

Thr Leu Gln Gln Ile Ile Asp Val Asp Glu Lys Asn Gln Ile Ile Thr
 50 55 60

Thr Asn Val Trp Leu Asn Leu Asp Trp Ile Asp Val Asn Leu Arg Trp
 65 70 75 80

Asn Pro Lys Asp Tyr Gly Gly Val Gln Asp Leu Arg Ile Pro Pro Asn
 85 90 95

Lys Ile Trp Lys Pro Asp Val Leu Met Tyr Asn Ser Ala Asp Glu Lys
 100 105 110

Phe Asp Gly Thr Tyr Pro Thr Asn Val Val Val Arg Ser Asn Gly Ser
 115 120 125

Cys Asn Tyr Ile Pro Pro Gly Ile Phe Lys Ser Thr Cys Lys Ile Asp
 130 135 140

Ile Thr Trp Phe Pro Phe Asp Asp Gln Lys Cys Asp Leu Lys Phe Gly
 145 150 155 160

ES 2 796 379 T3

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

Glu Gly Gly Asp Leu Thr Thr Tyr Ile Pro Asn Gly Glu Trp Asp Leu
 180 185 190

Ile Gly Val Pro Gly Val Arg Asn Val Arg Glu Tyr Ala Cys Cys Pro
 195 200 205

Glu Pro Tyr Ile Asp Ile Thr Tyr Thr Ile His Ile Arg Arg Arg Thr
 210 215 220

Leu Tyr Tyr Gly Phe Asn Leu Ile Ile Pro Cys Val Leu Ile Ser Ser
 225 230 235 240

Met Thr Leu Leu Gly Phe Thr Leu Pro Pro Asp Thr Gly Glu Arg Leu
 245 250 255

Thr Leu Gly Val Thr Ile Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Met Leu Gln
 260 265 270

Leu Ala Glu Thr Met Pro Pro Thr Ser Asp Ala Val Ser Ile Ile Gly
 275 280 285

Thr Tyr Phe Ala Cys Ile Met Ile Met Val Ala Phe Ser Val Val Met
 290 295 300

Thr Val Val Val Leu Asn Tyr His His Arg Asn Gln Glu Thr Thr Glu
 305 310 315 320

Met Pro Ala Leu Ile Arg Thr Val Phe Leu Val Trp Leu Pro Trp Leu
 325 330 335

Leu Arg Met Glu Pro Pro Gly Gln Lys Ala Asn Arg Arg Ser Leu Phe
 340 345 350

Leu Asn Ser Lys Met Lys Glu Leu Glu Leu Lys Glu Arg Ser Ser Arg
 355 360 365

Ser Leu Leu Ala Asn Val Leu Asp Ile Asp
 370 375

<210> 15
 <211> 1569
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> parte de ADNc basada en *Rhipicephalus microplus*

ES 2 796 379 T3

<400> 15
ctcgtggccg aggtggacga gacgtggtcg gctcgcgaga acgactcctc gtcgccgccg 60
ccgccgccac tgagtcacga gaagcggctg atggactcgc tgctgcgcca ctacgacgcc 120
agcgtgaggc ccgtcaagaa ctctcggag cccgtcatca ttcggctggg catcacgctc 180
acgcagatat tcgacctgga cgagaagaat caagtccaa caaccatcgt ttggcttgac 240
caggaatggt tcgacgagta cctcacttgg gaccogttgg agtttgaaa cttcagcaac 300
ctcaggctgc cctgccacaa gatttggtcg cctgacatcg ttctctacaa caacgcggac 360
gactacacgc ggggctactt ccagacgcgc gccatgatcg acccccaggg ccgagtgttc 420
tgcccgccac ccaccaagtt tcgcagcacc tgcccggctg acgtaacgta cttccctttc 480
gacgaccagg tctgcacaat gaagtccggt tcttgatct atgacgggct acaagtggac 540
atccagaacc ggacatccga ggttgacctg gtcaattaca tgcccaacgg cgagtgggag 600
ctgcttgagg cacgcatggt gcgcaacgtg gtctactacc cttgctgtcc agaccagccg 660
ttcccggaca tcaccgtggt cttggtcatg aggcgcaaga cgctctacta catgtacaac 720
gtggtcctgc cctgcatcat gatgtctgtg ctgactctgc tcgtctctg cctaccgccg 780
gactcgggcg agaagatcgc gctcggcgtc acagtgctgc tagcattctc cgtgttcatg 840
ctggccatag cggagaagat gcccgagaca tcggagtcca tacccttact gggaatatac 900
ctgacggccg tgatggccat cacgtccatc tcggctcgtca tgaccgtgat cgtcctcaac 960
ttccactacc gcggccccag ccggaaagaa gtgccagcgt ggctccgccg tctcctgctc 1020
aacaagtcac cctccagtcg tggttggttc tcgaagccgg cgcgccgcaa gaccgtcggc 1080
gacaatcacg tgcacttcta cgacttgcca tcgcgcacag cagcctcaa ggaccgctca 1140
gacctggacg acgacgtaga cggcagcaga agacctgcgg ccgacgacac cttccggctc 1200
gtcgtggaca gcgtcgtgat cggcagcga gaccgctaca ctcgcggcga gtacgccgag 1260
cactccgcga gcaacgagtc cccgagtccc gtccctccacg gcgacatgtc gcggaacaat 1320
gcctccgggt cggccaggca ccgccgctgt cgcgctggtg ccgctagtgg cggatccact 1380
aagcgcgtgc aggaagaagt gctgcggact ttgcggctacc tgatggagaa acagcagcgc 1440
gaggagcacc tcaccgggac tgtgaacgag tggagacaga tggctctcgt gatagatcgc 1500
accttgttct ggttctttct gatcatcaca gccgtgtcat ccrtctgctt cctagtcgctc 1560
ataccata 1569

<210> 16
<211> 1122
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> parte de ADNc basada en *Rhipicephalus microplus*

ES 2 796 379 T3

<400> 16
ctgctcaccg cgcctcagga ctctgaacaa ggcgcgcacg agcggcggct tctggcagac 60
ctgctggcca actacaacac cctggagcgg cccgtgctca acgagtcgga gccgctcatc 120
ctcagcttcg ggctcacact gcagcagatc atagacgtcg acgaaaagaa tcagctaatt 180
attacaaata tctggttaac attggattgg atagatgtga atctacgttg gaacccaaaa 240
gactacggcg gagtgcagga cctgcgtatt ccgccaacaa aaatttgaa gcctgacgtg 300
ctcatgtaca acagcgcgga cgaaaagttc gacggcacgt acccgaccaa cgtggtcgtg 360
cggagcaacg gcagttgcaa ctacatccct cctggcatct ttaagagcac gtgcaagatc 420
gacattacgt ggttcccttt tgacgatcag aagtgcgacc tgaagttcgg ctctctggacc 480
tatcacgggt atcagctgga ccttcgtgtc aacagtgagg aaggcgggga tctgactacc 540
tacattccca atggcgagtg ggacctgata ggcgtgcggy gagtgcgcaa cgttcgcgag 600
tatgcctgct gtccggagcc gtacatcgac atcacgtaca ccatccacat ccggcggcgc 660
acgctctact acggcttcaa cctcatcatt ccctgcgtgc tcatctcgtc catgactctg 720
ctcggtttca cgctgcccc cgacaccgga gagaggtca ccctgggtgt aaccattttg 780
ctgtccctga cggattcat gctccagctc gccgagacca tgcctccgac gtccgatgct 840
gtctccataa taggaactta ttttgctgc atcatgatca tggttgcctt ttcggtggtc 900
atgaccgtgg tggctctgaa ctatcatcac agaaatcaag agacgaccga aatgcctgct 960
ttgattcgca cgggttctct ggtgtggctc ccgtggcttc tgcgcatgga gcctccgggc 1020
cagaaggcga acaggcgcag cctcttctc aacagcaaga tgaaagagct cgagctgaag 1080
gagcgtcat cgcggagtct gctggccaac gtgctggaca tc 1122

<210> 17

<211> 1134

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> parte de ADNc basada en *Rhipicephalus microplus*

<400> 17

5

ES 2 796 379 T3

| | |
|--|------|
| atcgccgtgc tgctcaccgc gcctcaggac tctgaacaag gcgcgcacga gcggcggctt | 60 |
| ctggcagacc tgctggccaa ctacaacacc ctggagcggc ccgtgctcaa cgagtcggag | 120 |
| ccgctcatcc tcagcttcgg gctcacactg cagcagatca tagacgtcga cgaaaagaat | 180 |
| cagctaatta ttacaaatat ctggttaaca ttggattgga tagatgtgaa tctacgttgg | 240 |
| aaccctaaaag actacggcgg agtgcaggac ctgcgtattc cgccaaacaa aatttggag | 300 |
| cctgacgtgc tcatgtacaa cagcgcggac gaaaagtctg acggcacgta cccgaccaac | 360 |
| gtggtcgtgc ggagcaacgg cagttgcaac tacatccctc ctggcatctt taagagcacg | 420 |
| tgcaagatcg acattacgtg gttccctttt gacgatcaga agtgcgacct gaagttcggc | 480 |
| tcctggacct atcacggtta tcagctggac cttcgtgtca acagtgagga aggcggggat | 540 |
| ctgactacct acattcccaa tggcgagtgg gacctgatag gcgtgccggg agtgcgcaac | 600 |
| gttcgcgagt atgcctgctg tccggagccg tacatcgaca tcacgtacac catccacatc | 660 |
| cggcggcgca cgctctacta cggttcaac ctcatcattc cctgcgtgct catctcgtcc | 720 |
| atgactctgc tcggtttcac gctgcccccc gacaccggag agaggctcac cctgggtgta | 780 |
| accatthttgc tgtccctgac ggtattcatg ctccagctcg ccgagaccat gcctccgacg | 840 |
| tccgatgctg tctccataat aggaacttat tttgcctgca tcatgatcat ggttgccttt | 900 |
| tcggtggtca tgaccgtggt ggtcctgaac tatcatcaca gaaatcaaga gacgaccgaa | 960 |
| atgcctgctt tgattcgcac ggtgttcctg gtgtggctcc cgtggcttct gcgcatggag | 1020 |
| cctccggggcc agaaggcgaa caggcgcagc ctcttcctca acagcaagat gaaagagctc | 1080 |
| gagctgaagg agcgcctcatc gcggagtctg ctggccaacg tgctggacat cgac | 1134 |

<210> 18

<211> 1122

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> parte de ADNc basada en *Rhipicephalus microplus*

<400> 18

ES 2 796 379 T3

ctgctcaccg cgcctcagga ctctgaacaa ggcgcgcacg agcggcggct tctggcagac 60
ctgctggcca actacaacac cctggagcgg cccgtgctca acgagtcgga gccgctcatc 120
ctcagcttcg ggctcacact gcagcagatc atagacgtcg acgaaaagaa tcaaataata 180
acaacaaacg tgtgggtaaa tctggattgg atagatgtga atctacgttg gaacccaaaa 240
gactacggcg gagtgcagga cctgcgtatt ccgccaacaa aaatttgaa gcctgacgtg 300
ctcatgtaca acagcgcgga cgaaaagttc gacggcacgt acccgaccaa cgtggtcgtg 360
cggagcaacg gcagttgcaa ctacatccct cctggcatct ttaagagcac gtgcaagatc 420
gacattacgt ggttcccttt tgacgatcag aagtgcgacc tgaagttcgg ctccctggacc 480
tatcacggtt atcagctgga ccttcgtgtc aacagtgagg aaggcgggga tctgactacc 540
tacattcca atggcgagtg ggacctgata ggcgtgccgg gagtgcgcaa cgttcgcgag 600
tatgcctgct gtccggagcc gtacatcgac atcacgtaca ccatccacat ccggcggcgc 660
acgctctact acggcttcaa cctcatcatt ccctgcgtgc tcatctcgtc catgactctg 720
ctcggtttca cgctgcccc cgacaccgga gagaggctca ccctgggtgt aaccatthttg 780
ctgtccctga cggattcat gctccagctc gccgagacca tgcctccgac gtccgatgct 840
gtctccataa taggaactta ttttgctcgc atcatgatca tggttgcctt ttcggtggtc 900
atgaccgtgg tggtcctgaa ctatcatcac agaaatcaag agacgaccga aatgcctgct 960
ttgattcgca cgggtgtcct ggtgtggctc ccgtggcttc tgcgcatgga gcctccgggc 1020
cagaaggcga acaggcgcag cctcttcctc aacagcaaga tgaaagagct cgagctgaag 1080
gagcgtcat cgcggagtct gctggccaac gtgctggaca tc 1122

<210> 19
<211> 1134
<212> ADN
<213> secuencia artificial

5

<220>
<223> parte de ADNc basada en *Rhipicephalus microplus*
<400> 19

ES 2 796 379 T3

atcgccgtgc tgctcaccgc gcctcaggac tctgaacaag gcgcgcacga gcggcggctt 60
 ctggcagacc tgctggccaa ctacaacacc ctggagcggc ccgtgctcaa cgagtcggag 120
 ccgctcatcc tcagcttcgg gctcacactg cagcagatca tagacgtcga cgaaaagaat 180
 caaataataa caacaaacgt gtggttaaat ctggattgga tagatgtgaa tctacgttgg 240
 aaccctaaaag actacggcgg agtgcaggac ctgcgtattc cgccaaacaa aatttggaag 300
 cctgacgtgc tcatgtacaa cagcgcggac gaaaagttcg acggcacgta cccgaccaac 360
 gtggtcgtgc ggagcaacgg cagttgcaac tacatccctc ctggcatctt taagagcacg 420
 tgcaagatcg acattacgtg gttccctttt gacgatcaga agtgcgacct gaagtccggc 480
 tcctggacct atcacggtta tcagctggac cttcgtgtca acagtgagga aggcggggat 540
 ctgactacct acattcccaa tggcgagtg gacctgatag gcgtgccggg agtgcgcaac 600
 gttcgcgagt atgcctgctg tccggagccg tacatcgaca tcacgtacac catccacatc 660
 cggcggcgca cgctctacta cggcttcaac ctcatcattc cctgcgtgct catctcgtcc 720
 atgactctgc tcggtttcac gctgcccccc gacaccggag agaggctcac cctgggtgta 780
 accattttgc tgtccctgac ggtattcatg ctccagctcg ccgagaccat gcctccgacg 840
 tccgatgctg tctccataat aggaacttat tttgcctgca tcatgatcat ggttgccttt 900
 tcggtggtca tgaccgtggt ggtcctgaac tatcatcaca gaaatcaaga gacgaccgaa 960
 atgcctgctt tgattcgcac ggtgttctg gtgtggctcc cgtggcttct gcgcatggag 1020
 cctccgggcc agaaggcgaa caggcgcagc ctcttcctca acagcaagat gaaagagctc 1080
 gagctgaagg agcgtcatc gcggagtctg ctggccaacg tgctggacat cgac 1134

<210> 20

<211> 5185

<212> ADN

<213> *Rhipicephalus microplus*

<400> 20

5

ES 2 796 379 T3

acatggggaa agcccgtccg tgcctcgtc cgcgaggaca cgcttgccgc gccgggcgcg 60
 tccctactgt gctgcctctt tttcctcctg cagcgcaccac atcaccactt cgcctccaac 120
 cctgcaacag agatacgcct cttcgtggag agaacttcta gtcaactcgc cgcacgcaag 180
 ttttcctccc tgtggattgc tgcgctgcgt gaagcgaaac ttacaaagaa agtttttcgt 240
 tccccgcgcc tgtggattcc gatcgacgac gctggatcct ttgtagcgaa agttaggaac 300
 attagttttg tcaacgaggc tccctcgaag gcagcatttt tttcttcctt aaaaaaggg 360
 gtatgaggcg cgctacttaa tttttttttt tgtcttcctg agtcggtctg ggctttccgg 420
 aaattatttg ttctgcctt gaacagttct tgcgacgatt cataagaagt gtaaaattag 480
 cgccactttc gtaagaggaa caggaacctt aagaaaaaag agatacctgc aagtagagtt 540
 aaagctctct aatctaagca ttcctcccca cagagaaaaa cgcgcagtgt acttgatacg 600
 cgcagtaaac gcctagcaag gtatattgag gggcctgcgt cggcagcgag aagtttacgc 660
 gcggccaacc acgagcttta ctgcgagaa agaaagaaaa ggggacggga ctgcgaaagc 720
 ctaaaagctc aacctaatac aagtaaagca ggtcgttcag attgtcattt tgtcgagctg 780
 aagaagcgac ttcgctgcgt actcggcctt aatcgtagga cagaaggagc acccacatct 840
 gacgcagtgg tcaagggggg agacggtaca ggagacgtgg aagtgaaaac aaaaatcgcg 900
 aaggacaatg tcaagcaagt tgtcttcggt gtcaaaggcg gtcgcctcgc cgcgaaaacc 960
 cgtagtctgc gtgttgacaga gatggtcgat gttgggcgtc gaaacttgaa caaaaagcag 1020
 gagctggccg tttcaattga acctccacca tgtttcttcg gggactgatt ccagccatcg 1080
 tgtacgtgtg cctgtggacg gcctgcctcc tctccacaaa cctcgtggcc gaggtggacg 1140
 agacgtggtc ggctcgcgag aacgactcct cgtcgcgcc gccgccgcca ctgagtcacg 1200
 agaagcggct gatggactcg ctgctgcgcc actacgacgc cagcgtgagg cccgtcaaga 1260
 actcctcgga gcccgtcac attcggctgg gcatcacgct cacgcagata ttcgacctgg 1320
 acgagaagaa tcaagtccta acaaccatcg tttggcttga ccaggaatgg ttcgacgagt 1380
 acctcacttg ggaccggtg gagtttgaa acttcagcaa cctcaggctg ccctgccaca 1440
 agatttggct gcctgacatc gttctctaca acaacgcgga cgactacacg cggggctact 1500
 tccagacgcg cgccatgatc gacccccagg gccgagtgtt ctggccgcca cccaccaagt 1560
 ttcgcagcac ctgcccggtg gacgtaacgt acttcccttt cgacgaccag gtctgcacaa 1620
 tgaagttcgg ttcttgatc tatgacgggc tacaagtgga catccagaac cggacatccg 1680
 aggttgacct ggtcaattac atgcccacg gcgagtggga gctgcttgag gcacgcatgg 1740
 tgcgcaacgt ggtctactac ccttgctgtc cagaccagcc gttcccggac atcaccgtgg 1800

ES 2 796 379 T3

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| tcttggatcat | gagggcgaag | acgctctact | acatgtacaa | cgtggctcctg | ccctgcatca | 1860 |
| tgatgtctgt | gctgactctg | ctcgtcttct | gcctaccgcc | ggactcgggc | gagaagatcg | 1920 |
| cgctcggcgt | cacagtgctg | ctagcattct | ccgtgttcat | gctggccata | gcggaaga | 1980 |
| tgcccagac | atcggagtcc | atacccttac | tgggaatata | cctgacggcc | gtgatggcca | 2040 |
| tcacgtccat | ctcggtcgtc | atgaccgtga | tcgtcctcaa | cttcactac | cgcgccccca | 2100 |
| gccggaaaaga | agtgccagcg | tggctccgcc | gtctcctgct | caacaagtca | tcctccagtc | 2160 |
| gtggttggt | ctcgaagccg | gcgcgccga | agaccgtcgg | cgacaatcac | gtgcacttct | 2220 |
| acgacttgcc | atcgcgcaca | gcagcctcca | aggaccgctc | agacctggac | gacgacgtag | 2280 |
| acggcagcag | aagacctgcg | gccgacgaca | ccttccggct | cgtcgtggac | agcgtcgtga | 2340 |
| tcggcagcga | agaccgctac | actcgcggcg | agtacgccga | gcactccgcg | agcaacgagt | 2400 |
| ccccgagtcc | cgtcctccac | ggcgacatgt | cgcggaacaa | tgctccggg | tcggccaggc | 2460 |
| accgccgctg | tcgcgctggt | gccgctagtg | gcggatccac | taagcgcgtg | caggaagaag | 2520 |
| tgctgcggac | tttgcggtac | ctgatggaga | aacagcagcg | cgaggagcac | ctcacccgga | 2580 |
| ctgtgaacga | gtggagacag | atggctctcg | tgatagatcg | caccttgttc | tggttctttc | 2640 |
| tgatcatcac | agccgtgtca | tcrtctgct | tcctagtcgt | cataccata | cagaggcggg | 2700 |
| gactgtgact | gtgacttggg | cggagtgtg | agcaactctg | cattgccatg | acgtgctaaa | 2760 |
| acacttaaag | agagaggcag | acgggagaga | tcggagggat | tcatgtgtca | ccatthtgac | 2820 |
| taaactctgg | tggtatggag | cctgtattcg | tttcgcctaa | ataattggtt | tacaactctc | 2880 |
| taaaatacta | gcacatcgta | ggcgcgctga | agtttagtac | ttctcaagag | taaacgtag | 2940 |
| aaggcatctg | cagccttttt | gatgtagag | acaagtgtac | acacaatatt | gataatccta | 3000 |
| gccacgaatt | cttgctatgt | tcactctcga | gtttgctaaa | tattctttaa | cagcgcta | 3060 |
| attgtcta | ttctagacaa | gttgcatcta | ttgggaaaat | cagaggtgga | attcaciaag | 3120 |
| tatgtcactt | gttactattc | gtgattattg | accatcaagc | ttacataata | ttccagcat | 3180 |
| atgtgttgg | tgaaacttcc | tttaaattct | ttaaactaat | atgataatga | gtaaagaaag | 3240 |
| ttataagcca | agtttaaatac | tcaccgaggt | gtatcgtaca | aaacaccaat | aaaatgctgt | 3300 |
| ataattagtt | tcgctatcaa | atggtaagaa | cattattagt | ctttgaagat | atgcgagtct | 3360 |
| tattatgcag | tgtagacaca | tgcatcacct | tgagtgttgt | gattttgatt | aggcaaaatt | 3420 |
| aaaggtcgaa | acggtgatcc | aagcaattat | gtttcgcata | atataccttgc | gcctcctggt | 3480 |
| ggagtgtttg | tatatttttt | ctccttggaa | acaagcttgc | attcgtgcca | aaagagccac | 3540 |
| gttattacag | atgtgcgtcc | aagaaaagag | tgggcaaatg | aagtgtgtcc | acggagctta | 3600 |
| atgaatgcaa | ttattcagact | acaataacgt | cactttcaca | ctcacttctt | tgacggattg | 3660 |

ES 2 796 379 T3

cgcgtttttaa aaagcgcgat tgttcataat gtcttcogtcg aaaaccgctg tgctatatatt 3720
 aggtattgtc aggtttgtct ttgttagtgt gccctaccat catgtacaaa actggctcgag 3780
 aagaattcga ggaggtgcag gcaaaaaaat atatatttct tagtctgcag ccagtttctc 3840
 ctatagataa cgaaccacta ctatggtgcc tatgctgttc taaaaatcta acttagcgca 3900
 aaccagcact cgcacgttct caagcgtctg gcattacttt attaaggagg gatttcattg 3960
 agtgcaatca cgacagctcc atcaccgcga actcaccatg tgtgtgatac aacagaccgt 4020
 ttaactgcag tgctacagca taacttgtca taaatgggcc aaaatgagta accaaatatt 4080
 aggtataaag ttgcgtagct tttcacgacc actttcogca caccacatta agtatatagg 4140
 catgtgcgac acaggcacia aatcccggg aacatgactc aattcacagg attcacctct 4200
 gaattatfff ttttctttgc atcttagact gcatcttcat tattcaacca tctttaggct 4260
 tgcatagaaa tttcccacgt atttcctgcy acggcagtac tgaaagtacy tactaatctt 4320
 tagacaagtg ctcaagagta cacaagcaca tcgttgctca atactacact aatcatagta 4380
 tcttccggta gatgtatata gtgctagtga cttgtccatt gcttgccgct gctgtagtag 4440
 taattttacy catccaaagt gcgatcatgt agttgcttgc aaggcacgtg gatgataaaa 4500
 tatactacta cagcgatcta cagcgtttgt gtcttgtttt tgttgttggt acgttgttga 4560
 ttggtgtgag cggctgatga cgtagcattg tcatcaciaa cagcctggtg aacgcgatg 4620
 gcatctttgc gtcgagaata ccagcaaac tgaaacggag cgtgcatgga gcatttgcca 4680
 ccaatttacy acccctatff gtatgtgatt tgattaataa agtctgtgct cagggaagac 4740
 agaaatttgg acggcataaa gcagcctcgg gaaccactag caacgcactt aagcgtttgt 4800
 tttatagaaa aattttcttc tttcgtata ttgcgatcac ttggtggtgt tgggcctgct 4860
 taagtctctt cagatgcacc tatgcaciaa cgttcttttg atgcccagat catatcactg 4920
 ctcagaccga aatgcggacg agggcctgag cagcgggtgt acttgagcgc acgatttctg 4980
 atttttgcac agagatattt cctacttaag gcttccttct caaatccgac tgtggatttt 5040
 gtgtagagc gcaaaatttg tttgtctcca tgcacgcgag ctgctttagc cttacttgtg 5100
 ttttggggcg agaaaatctg tgtagttgtt tgtgcaataa acgaccacta caggaaaaaa 5160
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 5185

<210> 21
 <211> 2316
 <212> ADN
 <213> *Rhipicephalus microplus*

5

<400> 21
 gaagaggccc gcaggcccac cactcgcggc gtaccacgac gcggaccatg cgccccggac 60
 gcctgtctgt gccgctgcag ctaggcttct gcgccaacct gctgtggatc gccgtgctgc 120

ES 2 796 379 T3

tcaccgcgcc tcaggactct gaacaaggcg cgcacgagcg gcggttctg gcagacctgc 180
 tggccaacta caacaccctg gagcggcccg tgctcaacga gtcggagccg ctcatcctca 240
 gcttcgggct cacactgcag cagatcatag acgtcgacga aaagaatcag ctaattatta 300
 caaatatctg gttaacattg gattggatag atgtgaatct acgttgaac ccaaaagact 360
 acggcggagt gcaggacctg cgtattccgc caaacaaaat ttggaagcct gacgtgctca 420
 tgtacaacag cgcggacgaa aagttcgacg gcacgtaccc gaccaacgtg gtcgtgcgga 480
 gcaacggcag ttgcaactac atccctcctg gcatctttaa gagcacgtgc aagatcgaca 540
 ttacgtggtt cccttttgac gatcagaagt gcgacctgaa gttcggctcc tggacctatc 600
 acggttatca gctggacctt cgtgtcaaca gtgaggaagg cggggatctg actacctaca 660
 ttccaatgg cgagtgggac ctgataggcg tgccgggagt gcgcaacgtt cgcgagtatg 720
 cctgctgtcc ggagccgtac atcgacatca cgtacaccat ccacatccgg cggcgcacgc 780
 tctactacgg cttcaacctc atcattccct gcgtgctcat ctctccatg actctgctcg 840
 gtttcacgct gcccccgac accggagaga ggctcaccct ggggtgaacc attttgctgt 900
 ccctgacggt attcatgctc cagctcgcg agaccatgcc tccgacgtcc gatgctgtct 960
 ccataatagg aacttatttt gcctgcatca tgatcatggt tgccttttcg gtggtcatga 1020
 ccgtggtggt cctgaactat catcacagaa atcaagagac gaccgaaatg cctgctttga 1080
 ttgcacaggt gttcctggtg tggctcccgt ggcttctgcg catggagcct ccgggccaga 1140
 aggcgaacag gcgcagcctc ttctcaaca gcaagatgaa agagctcgag ctgaaggagc 1200
 gctcatcgcg gagtctgctg gccaacgtgc tggacatcga cgacgacttc cgacggcca 1260
 acagcgcgc cgccgccgcc gactgccacg ggtctcggac cccgttcctg ggcggtggcg 1320
 gcggggcgtc cacgggtgcac gcttgcgtcc actcgtcgcg tgaactgaac ttgatcttgc 1380
 gcgagctgcg cttcatcacg agccgcatgc gcaaggacga gcaagagcgg gaggtcgttg 1440
 gcgagtgga gttcgcggcc atggtcgtcg accgctgctg cctcatcatc ttctccctgt 1500
 tcaccatcat ctccacctgc gcctgcctct tctcggcgcc ccatctggtc gcctagcgca 1560
 ccctgctyct aggacagcac wttaaccgcc accagcttcc tccaccggcg gccttcctct 1620
 cggagagctt gttcgtctacg ttcttttgcg caagccctgc ttgtagagc gcggttcyg 1680
 agattgattg ctggagccaa tctcgaagc cacaatctca cagcgcgggc tcgtgtgca 1740
 gaacgtggct cgtgaagagt tccaggtgac gcccttggtg caacaycccg tgaagtccctg 1800
 tccacttccc cacgccatca cgtgcgaaga gatgcagcgc gaaacacgta ygacgcgaag 1860
 acttcgtacc gcaactgacc ttactgtggg gaggaggaag acacgtggag gtcgcaggag 1920
 ctagtTTTTT ttttaagtctc aactcatgtg ccaatcatga gccgccactt gtgcgaaagc 1980
 gttggaccat ctcgaggat ctggtagcac cgtccgaagc tgggtgccttg gccgtcgctt 2040

ES 2 796 379 T3

| | |
|---|------|
| tcattctata taggataaaa taacttcatg tatggctgcc aaactgtttg aagggtcaag | 2100 |
| cggacttata aaccgagccc aacgaaggaa gtaaagcacc gggctctccc tctacgagct | 2160 |
| tcgtgatcgt gagatgcccg ccatgatgcg acgccactyg ttacttgctt gaccaccgtc | 2220 |
| atggacggct cgtcggagta ggataagcca cgcrcgcaac gtcactttgc cagtcctttc | 2280 |
| tttcgtcggt gaatggtgcg tatgagtaaa aaaaaa | 2316 |

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de la lista que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 9, o un fragmento de la misma, que codifica un fragmento funcional de una subunidad del receptor nACh.
- 5 2. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que la molécula de ácido nucleico comprende además una o más regiones reguladoras unidas operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha secuencia de aminoácidos.
3. Un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
4. El polipéptido de la reivindicación 3, que está incluido en un homopentámero.
- 10 5. Un procedimiento de identificación de un compuesto capaz de modular la actividad de un receptor nACh de *Rhipicephalus*, comprendiendo el procedimiento, poner en contacto un polipéptido según la reivindicación 3 o 4, con un compuesto que se sospecha que modula la actividad de un receptor nACh de *Rhipicephalus*, y detectar la actividad del polipéptido.
- 15 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el polipéptido según la reivindicación 3 o 4 está incluido en una célula huésped.
7. El procedimiento de las reivindicaciones 5 o 6, en el que detectar la actividad del polipéptido comprende comparar la actividad del polipéptido con una medición de control y/o con un valor umbral.

| grupo de nAChR | Subunidad | Observaciones |
|----------------|---------------------------|--|
| D α 1 | Rmicro_nAChR α 1 | 98,6% similar al nAChR α 1 de <i>R. sanguineus</i> |
| | Rmicro_nAChR α 1.2 | Agrupaciones con α 1S de insecto |
| D α 3 | Rmicro_nAChR α 3 | Distinta rama con α 3 de <i>I. scapularis</i> (77,3% similar) |
| D α 5-7 | Rmicro_nAChR α 5 | UTR largas de extremos 5' y 3' |
| | Rmicro_nAChR α 6 | 69 % similar al nAChR α 6 de <i>D. melanogaster</i> |

| grupo de nAChR | Subunidad | Observaciones |
|-------------------------|--------------------------|--|
| D β 2 | Rmicro_nAChR α 8 | Similar a otras secuencias α 8 de insecto (~ 60%) |
| D β 1 | Rmicro_nAChR β 1 | Distinta rama con α 3 de <i>I. scapularis</i> (88% similar) |
| Subunidades divergentes | Rmicro_nAChR β 3.1 | Identidad de secuencia baja con otros nAChR |
| | Rmicro_nAChR β 3.2 | |
| | Rmicro_nAChR β 3.3 | |
| | Rmicro_nAChR β 3.4 | |

Fig. 1

ACCTCCACCATGTTTTCTTCGGGGACTGATTCCAGCCATCGTGTACGTGTGCCTGTGGAC
GGCCTGCCTCCTCTCCACAAACCTCGTGGCCGAGGTGGACGAGACGTGGTTCGGCTCGCG
AGAACGACTCCTCGTCGCCGCCGCCGCCACTGAGTCACGAGAAGCGGCTGATGGAC
TCGCTGCTGCGCCACTACGACGCCAGCGTGAGGCCCGTCAAGAACTCCTCGGAGCCCGT
CATCATTCGGCTGGGCATCACGCTCACGCAGATATTCGACCTGGACGAGAAGAATCAAG
TCCTAACAACCATCGTTTGGCTTGACCAGGAATGGTTTCGACGAGTACCTCACTTGGGAC
CCGTTGGAGTTTGGAAACTTCAGCAACCTCAGGCTGCCCTGCCACAAGATTTGGCTGCC
TGACATCGTTCTCTACAACAACGCGGACGACTACACGCGGGGCTACTTCCAGACGCGCG
CCATGATCGACCCCCAGGGCCGAGTGTTCGCGCCACCCACCAAGTTTTCGCAGCACC
TGCCCGGTGGACGTAACGTACTTCCCTTTCGACGACCAGGTCTGCACAATGAAGTTCGG
TTCTTGGATCTATGACGGGCTACAAGTGGACATCCAGAACC GGACATCCGAGGTTGACC
TGGTCAATTACATGCCCAACGGCGAGTGGGAGCTGCTTGAGGCACGCATGGTGC GCAAC
GTGGTCTACTACCCTTGCTGTCCAGACCAGCCGTTCCCGGACATCACCGTGGTCTTGGT
CATGAGGCGCAAGACGCTCTACTACATGTACAACGTGGTCTGCCCTGCATCATGATGT
CTGTGCTGACTCTGCTCGTCTTCTGCCTACCGCCGACTCGGGCGAGAAGATCGCGCTC
GGCGTCACAGTGCTGCTAGCATTCTCCGTGTTTCATGCTGGCCATAGCGGAGAAGATGCC
CGAGACATCGGAGTCCATAACCCTTACTGGGAATATACCTGACGGCCGTGATGGCCATCA
CGTCCATCTCGGTCGTTCATGACCGTGATCGTCCTCAACTTCCACTACCGCGGCCCCAGC
CGGAAAGAAGTGCCAGCGTGGCTCCGCGCTCTCCTGCTCAACAAGTCATCCTCCAGTCG
TGGTTGGTTCTCGAAGCCGGCGCGCCGCAAGACCGTCGGCGACAATCACGTGCACTTCT
ACGACTTGCCATCGCGCACAGCAGCCTCCAAGGACCGCTCAGACCTGGACGACGACGTA
GACGGCAGCAGAAGACCTGCGGCCGACGACACCTTCCGGCTCGTTCGTGGACAGCGTCGT
GATCGGCAGCGAAGACCGCTACACTCGCGGCGAGTACGCCGAGCACTCCGCGAGCAACG
AGTCCCCGAGTCCCGTCTCCACGGCGACATGTCGCGGAACAATGCCTCCGGGTCGGCC
AGGCACCGCCGCTGTGCGCTGGTGGCGCTAGTGGCGGATCCACTAAGCGCGTGCAGGA
AGAAGTGCTGCGGACTTTGCGGTACCTGATGGAGAAACAGCAGCGCGAGGAGCACCTCA
CCCGGACTGTGAACGAGTGGAGACAGATGGCTCTCGTGATAGATCGCACCTTGTTCGG
TTCTTTCTGATCATCACAGCCGTGTCATCCRTCTGCTTCCCTAGTCGTCATACCCATACA
GAGGCGGGGACTGTGACTGTGACTTGGGCGGAGTTGTGAGCAACTCTGCATTGCCATGA
CGTGCTAAAACACTTAAAGAGAGAGGCAGACGGGAGAGATCCGAGGGATTCATGTGTCA
CCA

Fig. 2

MFLRGLIPAIVYVCLWTACLLSTNLVAEVDETWSARENDSSSPPPPPLSHEKR
 LMDSLRLHYDASVRPVKNSSEPVIIRLGITLTQIFDLDEKNQVLTITVWLDQE
Bucle D
WFDEYLTWDPLEFGNFSNLRLPCHKIWLPDIVLYNNADDYTRGYFQTRAMI
Bucle D Bucle A Bucle E
DPQGRVFWPPPTKFRSTCPVDVTYFPFDDQVCTMKFGSWIYDGLQVDIQNR
Bucle E Bucle B Bucle F
TSEVDLVNYMPNGEWELLEARMVRNVVYPCCPDQFPPDITVVLVMRRKT
Bucle F Bucle C
LYYMYNVVLPCIMMSVLTLLVFCIPPDSGEKIALGVTVLLAFSVFMLAIAEK
TM1 TM2
MPETSESIPLLGYLTAVMAITSISVMTVIVLNFHYRGPSRKEVPAWLRRL
TM2 TM3
 LNKSSSRGWFSKPARRKTVGDNHVHFYDLP SR TAASKDRSDLD DDDVDGSR
 RPAADDTFRLVVD SVVIGSEDRYTRGEYAEHSASNES PSPVLHGDMSRNNAS
 GSARHRRCRAGAASGGSTKRVQEEVLR TLRYLMEKQQREEHLTRTVNEWR
 QMALVIDRT LFWFFLIITAVSSVCFLVVIPIQRRGL
TM4

Fig. 3

ACCACGACGCGGACCATGCGCCCCGGACGCCTGTCTGTGCCGCTGCAGCTAGGCTTCTGCGCCAA
 CCTGCTGTGGATCGCCGTGCTGCTCACC GCGCCTCAGGACTCTGAACAAGGCGCGCACGAGCGGC
 GGCTTCTGGCAGACCTGCTGGCCAACTACAACACCCTGGAGCGGCCCGTGCTCAACGAGTCGGAG
 CCGCTCATCCTCAGCTTCGGGCTCACACTGCAGCAGATCATAGACGTCGACGAAAAGAATCAGCT
AATTATTACAAATATCTGGTTAACATTGGATTGGATAGATGTGAATCTACGTTGGAACCCAAAAG
 ACTACGGCGGAGTGCAGGACCTGCGTATTCCGCCAAACAAAATTTGGAAGCCTGACGTGCTCATG
 TACAACAGCGCGGACGAAAAGTTCGACGGCAGCTACCCGACCAACGTGGTCGTGCGGAGCAACGG
 CAGTTGCAACTACATCCCTCCTGGCATCTTTAAGAGCACGTGCAAGATCGACATTACGTGGTTCC
 CTTTTGACGATCAGAAGTGCAGCCTGAAGTTCGGCTCCTGGACCTATCACGGTTATCAGCTGGAC
 CTTGCTGTCAACAGTGAGGAAGGCGGGGATCTGACTACCTACATTCCTCAATGGCGAGTGGGACCT
 GATAGGCGTGCCGGGAGTGC GCAACGTTCCGCGAGTATGCCTGCTGTCCGGAGCCGTACATCGACA
 TCACGTACACCATCCACATCCGGCGGGCGACGCTCTACTACGGCTTCAACCTCATCATCCCTGC
 GTGCTCATCTCGTCCATGACTCTGCTCGGTTTTACGCTGCCCCCGACACCGGAGAGAGGGCTCAC
 CCTGGGTGTAACCATTTTGCTGTCCCTGACGGTATTCATGCTCCAGCTCGCCGAGACCATGCCTC
 CGAGTCCGATGCTGTCTCATAATAGGAACTTATTTTGCTGCATCATGATCATGGTTGCCTTT
 TCGGTGGTCATGACCGTGGTGGTCTGAACTATCATCACAGAAATCAAGAGACGACCGAAATGCC
 TGCTTTGATTTCGCACGGTGTTCCTGGTGTGGCTCCCGTGGCTTCTGCGCATGGAGCCTCCGGGCC
 AGAAGGCGAACAGGCGCAGCCTCTTCTCAACAGCAAGATGAAAGAGCTCGAGCTGAAGGAGCGC
 TCATCGCGGAGTCTGCTGGCCAACGTGCTGGACATCGACGACGACTTCGCGACGGCCAACAGCGC
 CGCCGCCCGCCGACTGCCACGGGTCTCGGACCCCGTTCTGGGCGGTGGCGGCGGGGCGTCCA
 CGGTGCACGCTTGCCTCCACTCGTCGCGTGAAGTGAAGTTCGCTTGC GCGAGCTGCGCTTCATC
 ACGAGCCGATGCGCAAGGACGAGCAAGAGCGGGAGGTCGTTGGCGAGTGGAAGTTCGCGGCCAT
 GGTGCTCGACCGCTGCTGCCTCATCATCTTCTCCCTGTTACCATCATCTCCACCTGCGCCTGCC
 TCTTCTCGGCGCCCCATCTGGTTCGCTAGCGCACCCCTGCT

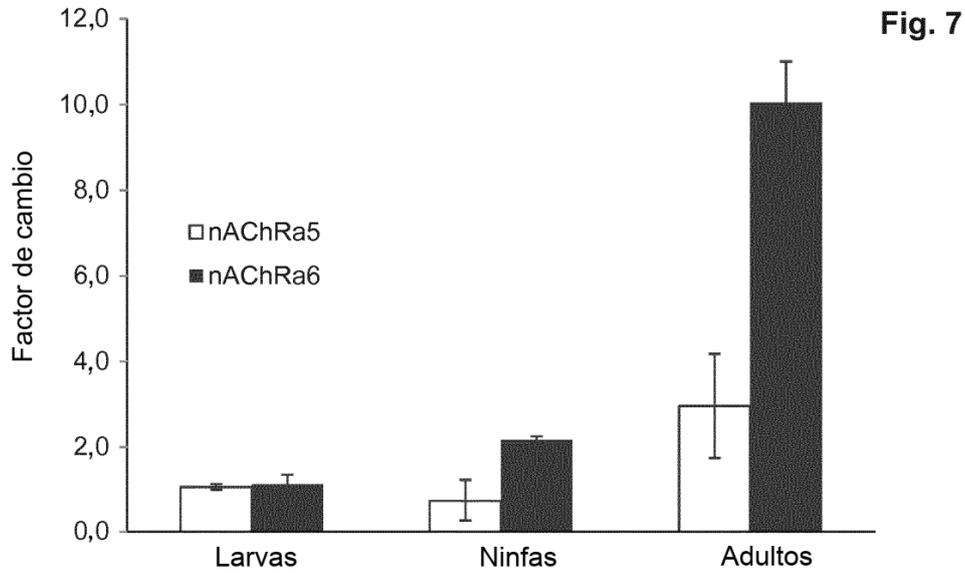
Fig. 4

M R P G R L S V P L Q L G F C A N L L W I A V L L T A P Q D S E Q G A H E R
 R L L A D L L A N Y N T L E R P V L N E S E P L I L S F G L T L Q Q I I D V
 D E K N Q L I I T N I W L T L D W I D V N L R W N P K D Y G G V Q D L R I P
Bucle D
 P N K I W K P D V L M Y N S A D E K F D G T Y P T N V V V R S N G S C N Y I
Bucle A *Bucle E*
 P P G I F K S T C K I D I T W F P F D D Q K C D L K F G S W T Y H G Y Q L D
Bucle B
 L R V N S E E G G D L T T Y I P N G E W D L I G V P G V R N V R E Y A C C P
Bucle F *Bucle C*
E P Y I D I T Y T I H I R R R T L Y Y G F N L I I P C V L I S S M T L L G F
Bucle C *TM1*
T L P P D T G E R L T L G V T I L L S L T V F M L Q L A E T M P P T S D A V
TM1 *TM2*
 S I I G T Y F A C I M I M V A F S V V M T V V V L N Y H H R N Q E T T E M P
TM3
 A L I R T V F L V W L P W L L R M E P P G Q K A N R R S L F L N S K M K E L
 E L K E R S S R S L L A N V L D I D D D F R T A N S A A A A A D C H G S R T
 P F L G G G G G A S T V H A C V H S S R E L N L I L R E L R F I T S R M R K
 D E Q E R E V V G E W K F A A M V V D R C C L I I F S L F T I I S T C A C L
 F S A P H L V A

Fig. 5

| Combinación de subunidades(en pCR4) | Funcionalidad |
|--|---------------|
| R α 1:R α 1.2:R α 3:R β 1 | - |
| R α 5 | Sí |
| R α 6 | Sí |
| R β 3.1 | - |
| R β 3.2 | - |
| R β 3.4 | - |
| R β 3.1:R β 3.2:R β 3.4 | - |
| Combinación de subunidades (en pGEMHE) | Funcionalidad |
| R α 1:R α 2 β 2 | Sí |
| R α 3: R α 2 β 2 | - |
| R α 1:R β 1 | - |
| R α 6 | Sí |

Fig. 6



ACATGGGGAAAGCCCGTCCGTCGCCTCGTCCGCGAGGACACGCTTGCCGCGCCGGGCGCGTCCC
TACTGTGCTGCCTCTTTTCCTCCTGCAGCGCCACATCACCACCTTCGCCTCCAACCCTGCAAC
AGAGATACGCCTCTTCGTGGAGAGAACTTCTAGTCAACTCGCCGCACGCAAGTTTTCCTCCCTG
TGGATTGCTGCGCTGCGTGAAGCGAACTTACAAAGAAAGTTTTTCGTTCCCCGCGCTGTGGA
TTCCGATCGACGACGCTGGATCTTTTGTAGCGAAAGTTAGGAACATTAGTTTTGTCAACGAGGC
TCCCTCGAAGGCAGCATTTTTTCTTCTTAAAAAGGGTGTATGAGGCGCGCTACTTAATTTT
TTTTTTTGTCTTCCGAGTCGGTCTGGGCTTTCGGAAATTATTTGTTCCCTGCCTGAAACAGTT
CTTCGAGCAGTTCATAAGAAGTGTAATAATTAGCGCCACTTTCGTAAGAGGAACAGGAACCTTAA
GAAAAAAGAGATACCTGCAAGTAGAGTTAAAGCTCTCTAATCTAAGCATTCCTCCCCACAGAGA
AAAACGCGCAGTGTACTTGATACGCGCAGTAAACGCCTAGCAAGGTATATTGAGGGCCTGCGT
CGGCAGCGAGAAGTTTACGCGCGGCCAACACGAGCTTACTGCGCAGAAAGAAAAGGGG
ACGGGACTGCGAAAAGCCTAAAAGCTCAACCTAATCAAAGTAAAGCAGGTTCGTTTCAGATTGTCAI
TTTGTGAGCTGAAGAAGCGACTTCGCTGCGTACTCGGCCTTAATCGTAGGACAGAAGGAGCAC
CCACATCTGACGCAAGTGGTCGAAGGGGAGACGGTACAGGAGACGTGGAAGTGAAAACAAAAAT
CGCGAAGGACAATGTCGAGCAAGTTGTCTTCGTTGTCAAAGGCGGTTCGCCTCGCCGCGAAAACC
CGTAGTCTGCGTGTGTCAGAGATGGTTCGATGTTGGGCGTCGAAACTTGAACAAAAAGCAGGAGC
TGGCCGTTTTCAATTGAACCTCCACCATGTTTCTTCGGGACTGATTCAGCCATCGTGTACGTG
TGCCTGTGGACGGCTGCCTCCTCTCCACAAACCTCGTGGCCGAGGTGGACGAGACGTGGTCCG
CTCGCGAGAACGACTCCTCGTCGCCGCGCCGCGCCACTGAGTCACGAGAAGCGGCTGATGGA
CTCGCTGCTGCGCCACTACGACGCCAGCGTGAGGCCCGTCAAGAACTCCTCGGAGCCCGTCATC
ATTCCGGCTGGGCATCACGCTCACGCAGATATTCGACCTGGACGAGAAGAATCAAGTCTTAACAA
CCATCGTTTTGGCTTGACCAGGAATGGTTCGACGAGTACCTCACTTGGGACCCGTTGGAGTTTGG
AAACTTCAGCAACCTCAGGCTGCCCTGCCACAAGATTTGGCTGCCTGACATCGTTCTCTACAAC

Fig. 8 (continúa en la siguiente página)

AACGCGGACGACTACACGCGGGGCTACTTCCAGACGCGCGCCATGATCGACCCCCAGGGCCGAG
 TGTTCCTGGCCGCCACCCACCAAGTTTTCGCAGCACCTGCCCGGTGGACGTAACGTACTTCCCTTT
 CGACGACCAGGTCTGCACAATGAAGTTCGGTCTTGGATCTATGACGGGCTACAAGTGGACATC
 CAGAACC GGACATCCGAGGTTGACCTGGTCAATTACATGCCAACGGCGAGTGGGAGCTGCTTG
 AGGCACGCATGGTGCGCAACGTGGTCTACTACCCCTGCTGTCCAGACCAGCCGTTCCCGGACAT
 CACCGTGGTCTTGGTCATGAGGCGCAAGACGCTCTACTACATGTACAACGTGGTCCTGCCCTGC
 ATCATGATGTCTGTGCTGACTCTGCTCGTCTTCTGCCTACCGCCGGACTCGGGCGAGAAGATCG
 CGCTCGGCGTCACAGTGTGCTAGCATTCTCCGTGTTTCATGCTGGCCATAGCGGAGAAGATGCC
 CGAGACATCGGAGTCCATACCCTTACTGGGAATATACCTGACGGCCGTGATGGCCATCACGTCC
 ATCTCGGTGCTCATGACCGTGTGCTCCTCAACTTCCACTACCGCGGCCCCAGCCGGAAGAAG
 TGCCAGCGTGGCTCCGCGCTCTCCTGCTCAACAAGTCATCCTCCAGTCGTGGTTGGTTCTCGAA
 GCCGGCGCGCCGAAGACCGTCCGGCGACAATCACGTGCACCTTCTACGACTTGCATCGCGCACA
 GCAGCCTCCAAGGACCGCTCAGACCTGGACGACGACGTAGACGGCAGCAGAAGACCTGCGGCCG
 ACGACACCTTCCGGCTCGTGTGGACAGCGTGTGATCGGCAGCGAAGACCGCTACACTCGCGG
 CGAGTACGCCGAGCACTCCGCGAGCAACGAGTCCCCGAGTCCCGTCTCCACGGCGACATGTGCG
 CGGAACAATGCCTCCGGGTCCGCCAGGCACCGCCGCTGTGCGCTGGTGCCGCTAGTGGCGGAT
 CCACTAAGCGCGTGCAGGAAGAAGTGTGCGGACTTTGCGGTACCTGATGGAGAAACAGCAGCG
 CGAGGAGCACCTCACCCGGACTGTGAACGAGTGGAGACAGATGGCTCTCGTGATAGATCGCACC
 TTGTTCTGGTTCTTTCTGATCATCACAGCCGTGTCCRTCTGCTTCCCTAGTCGTACATACCCA
 TACAGAGGCGGGGACTGTGACTGTGACTTGGGCGGAGTTGTGAGCAACTCTGCATTGCCATGAC
 GTGCTAAAACACTTAAAGAGAGAGGCAGACGGGAGAGATCCGAGGGATTCATGTGTACCATTT
 TGACTAAACTCTGGTGGTATGGAGCCTGTATTCGTTTCGCCTAAATAATTGGTTTACAACCTCTC
 TAAAATACTAGCACATCGTAGGCGCGCTGAAGTTTAGTACTTCTCAAGAGTAAACGTTAGAAGG
 CATCTGCAGCCTTTTTGATGTTAGAGACAAGTGTACACACAATATTGATAATCCTAGCCACGAA
 TTCTTGCTATGTTTCATCTCGGAGTTTGCTAAATATCTTTAACAGCGCTAATATTGTCTAATTT
 CTAGACAAGTTGCATCTATTGGGAAAATCAGAGGTGGAATTCACAAAGTATGTCACTTGTACT
 ATTCGTGATTATTGACCATCAAGCTTACATAATATTTCCAGCATATGTGTTGGTTGAACTTCC
 TTTAAATCTTTAAACTAATATGATAATGAGTAAAGAAAGTTATAAGCCAAGTTTAAATCTCAC
 CGAGGTGTATCGTACAAAACACCAATAAAATGCTGTATAATTAGTTTTCGCTATCAAATGGTAAG
 AACATTATTAGTCTTTGAAGATATGCGAGTCTTATTATGCAGTGTACACACATGCATCACCTTG
 AGTGTGTGATTTTATTAGGCAAAATTAAGGTCGAAACGGTGATCCAAGCAATTATGTTTCG
 CATAATATCCTTGGCCCTCCTGTTGGAGTGTGTTGATATTTTTTCTCCTTGGAAACAAGCTTGC
 ATTCGTGCCAAAAGAGCCACGTTATTACAGATGTGCGTCCAAGAAAAGAGTGGGCAAATGAAGT
 GTGTCCACGGAGCTTAATGAATGCAATTATTCGACTACAATAACGTCACTTTCACACTCACTTC
 TTTGACGGATTGCGCGTTTTTAAAAGCGCGATTGTTTATAATGTCTTCGTGCGAAAACCGCTGTG
 CTATATTTAGGTATTGTCAGGTTTGTCTTTGTTAGTGTGCCCTACCATCATGTACAAAACCTGGT
 CGAGAAGAATTCGAGGAGGTGCAGGCAAAAAAATATATATTTCTTAGTCTGCAGCCAGTTTCTC
 CTATAGATAACGAACCACTACTATGGTGCCTATGCTGTTCTAAAAATCTAACTTAGCGCAAACC
 AGCACTCGCACGTTCTCAAGCGTCTGGCATTACTTTATTAAGGAGGGATTTCAATTGAGTGAAT
 CACGACAGCTCCATCACCGGCAACTCACCATGTGTGTGATACAACAGACCGTTTAACTGCAGTG
 CTACAGCATAACTTGTACATAAATGGGCCAAAATGAGTAACCAAAATATTAGGTATAAAGTTGCGT
 AGCTTTTTCACGACCACTTTCGCAACACCACATTAAGTATATAGGCATGTGCGACACAGGCACAA
 AAATCCCGGGAACATGACTCAATTCACAGGATTCACCTCTGAATTATTTTTTTCTTTGCATCT

Fig. 8 (continúa en la siguiente página)

TAGACTGCATCTTCATTATTCAACCATCTTTAGGCTTGCATAGAAAATTTCCACGTATTTCCCTG
 CGACGGCAGTACTGAAAGTACGTACTAATCTTTAGACAAGTGCTCAGAGTAACACAAGCACATC
 GTTGCTCAATACTACACTAATCATAGTATCTTCCGGTAGATGTATATCGTGCTAGTGACTTGTG
 CATTGCTTGCCGCTGCTGTAGTAGTAATTTTACGCATCCAAAGTGCGATCATGTAGTTGCTTGC
 AAGGCACGTGGATGATAAAATATACTACTACAGCGATCTACAGCGTTTGTGTCTTGTTTTTGT
 GTTGTACGTTGTTGATTGGTGTGAGCGGTGATGACGTAGCATTGTCATCACAAACAGCCTGT
 TGAACGCGTATGGCATCTTTGCGTCGAGAATACCAGCAAAACTGAAACGGAGCGTGCATGGAGC
 ATTTGCGACCAATTTACGACCCCTATTTGTATGTGATTTGATTAATAAAGTCTGTGCTCAGGGA
 AGACAGAAAATTTGGACGGCATAAAGCAGCCTCGGGAACCACTAGCAACGCACTTAAGCGTTTGT
 TTTATAGAAAAATTTCTTCTTTTCGCTATATTGCGATCACTTGTGTTGTGGGCCTGCTTAAG
 TTCTTTTCAGATGCACCTATGCACAACCGTTCTTTTGATGCCCGAGTCATATCACTGCTCAGACC
 GAAATGCGGACGAGGGCCTGAGCAGCGGTGTGACTTGAGCGCACGATTTTCGTATTTTTGCACAG
 AGATATTTCTACTTAAGGCTTCCTTCTCAAATCCGACTGTGGATTTTGTGTTAGAGCGCAAAA
 TTTGTTTGTCTCCATGCACGCGAGCTGCTTTAGCCTTACTTGTGTTTGGGGCGAGAAAATCTG
 TGTAGTTGTTTGTGCAATAAACGACCACTACAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 A

Fig. 8 (continuación de la página anterior)

GAAGAGGCCCGCAGGCCACCACCTCGCGGCGTACCACGACGCGGACCATGCGCCCCGGACGCCT
 GTCTGTGCCGCTGCAGCTAGGCTTCTGCGCCAACCTGCTGTGGATCGCCGTGCTGCTCACC
 CCTCAGGACTCTGAACAAGGCGCGCACGAGCGCGGCTTCTGGCAGACCTGCTGGCCAACTACA
 ACACCCTGGAGCGGCCCGTGTCAACGAGTCGAGCCGCTCATCCTCAGCTTCGGGCTCACACT
 GCAGCAGATCATAGACGTCGACGAAAAGAATCAGCTAATTATTACAAATATCTGGTTAACATTG
 GATTGGATAGATGTGAATCTACGTTGGAACCCAAAAGACTACGGCGGAGTGCAGGACCTGCGTA
 TTCCGCCAAAACAAAATTTGGAAGCCTGACGTGCTCATGTACAACAGCGCGGACGAAAAGTTCGA
 CGGCACGTACCCGACCAACGTGGTCTGCGGAGCAACGGCAGTTGCAACTACATCCCTCCTGGC
 ATCTTTAAGAGCACGTGCAAGATCGACATTACGTGGTTCCCTTTTGACGATCAGAAGTGCAGCC
 TGAAGTTCGGCTCCTGGACCTATCACGGTTATCAGCTGGACCTTCGTGTCAACAGTGAGGAAGG
 CGGGGATCTGACTACCTACATTTCCAATGGCGAGTGGGACCTGATAGGCGTGCCGGGAGTGC
 AACGTTTCGCGAGTATGCCTGCTGTCCGGAGCCGTACATCGACATCACGTACACCATCCACATCC
 GGCGGCGCACGCTCTACTACGGCTTCAACCTCATCTCCCTGCGTGCTCATCTCGTCCATGAC
 TCTGCTCGGTTTACGCTGCCCCCCGACACCGGAGAGAGGCTCACCCCTGGGTGTAACCATTTTG
 CTGTCCCTGACGGTATTCATGCTCCAGCTCGCCGAGACCATGCCTCCGACGTCCGATGCTGTCT
 CCATAATAGGAACTTATTTTGCCTGCATCATGATCATGGTTGCCTTTTCGGTGGTCATGACCGT
 GGTGGTCTGAACTATCATCACAGAAATCAAGAGACGACCGAAATGCCTGCTTTGATTGCGACG
 GTGTTCCCTGGTGTGGCTCCCGTGGCTTCTGCGCATGGAGCCTCCGGGCCAGAAGGCGAACAGGC
 GCAGCCTCTTCTCAACAGCAAGATGAAAGAGCTCGAGCTGAAGGAGCGCTCATCGCGGAGTCT
 GCTGGCCAAACGTGCTGGACATCGACGACGACTTCCGCACGGCCAACAGCGCCGCCGCCGCC
 GACTGCCACGGGTCTCGGACCCCGTTCTGGGCGGTGGCGGGGGCGTCCACGGTGCACGCTT
 GCGTCCACTCGTCGCGTGAACCTGAACCTTGATCTTGC CGGAGCTGCGCTTTCATCACGAGCCG
 CATGCGCAAGGACGAGCAAGAGCGGGAGGTGCTTGGCGAGTGGAAAGTTTCGCGGCCATGGT
 CGTGCACGCTGCTCATCTTCTCCCTGTTTACCATCATCTCCACCTGCGCCTGCCTCTTCTCGG
 CGCCCCATCTGGTTCGCTAGCGCACCCCTGCTYCTAGGACAGCACWTTAACCGCCACCAGCTTCC

Fig. 9 (continúa en la siguiente página)

TCCACCGGCGGCCTTCCTCTCGGAGAGCTTGTTGCTACGTTCTTTTGCGCAAGCCCTGCTTGT
 TAGAGCGCGGCTTCYGAGATTGATTGCTGGAGCCAATCTCGAAGGCCACAATCTCACAGCGCGG
 GCTCGTGTGCGAGAACGTGGCTCGTGAAGAGTTCCAGGTGACGCCCTTGTTGCAACAYCCCGTG
 AAGTCTGTCCACTTCCCCACGCCATCACGTGCGAAGAGATGCAGCGCGAAACACGTAYGACGC
 GAAGACTTCGTACCGCACTGACCCTTACTGTGGGGAGGAGGAAGACACGTGGAGGTCGCAGGAG
 CTAGTTTTTTTTTAAGTCTCAACTCATGTGCCAATCATGAGCCGCCACTTGTGCGAAAGCGTTG
 GACCATCTCGGAGGATCTGGTAGCACCGTCCGAAGCTGGTGCCTTGCCGTCGCTTTCATTCTA
 TATAGGATAAAAATACTTCATGTATGGCTGCCAAACTGTTTGAAGGGTCAAGCGGACTTATCAA
 CCGAGCCCAACGAAGGAAGTAAAGCACCGGGTCTTCCCTCTACGAGCTTCGTGATCGTGAGATG
 CCCGCCATGATGCGACGCCACTYGTACTTGGCTTGACCACCGTCATGGACGGCTCGTCGGAGTA
 GGATAAGCCACGCRGCAACGTATCTTGCCAGTCCTTTCTTTTCGTGCGGTGAATGGTGCATG
 AGTAAAAA

Fig. 9 (continuación de la página anterior)

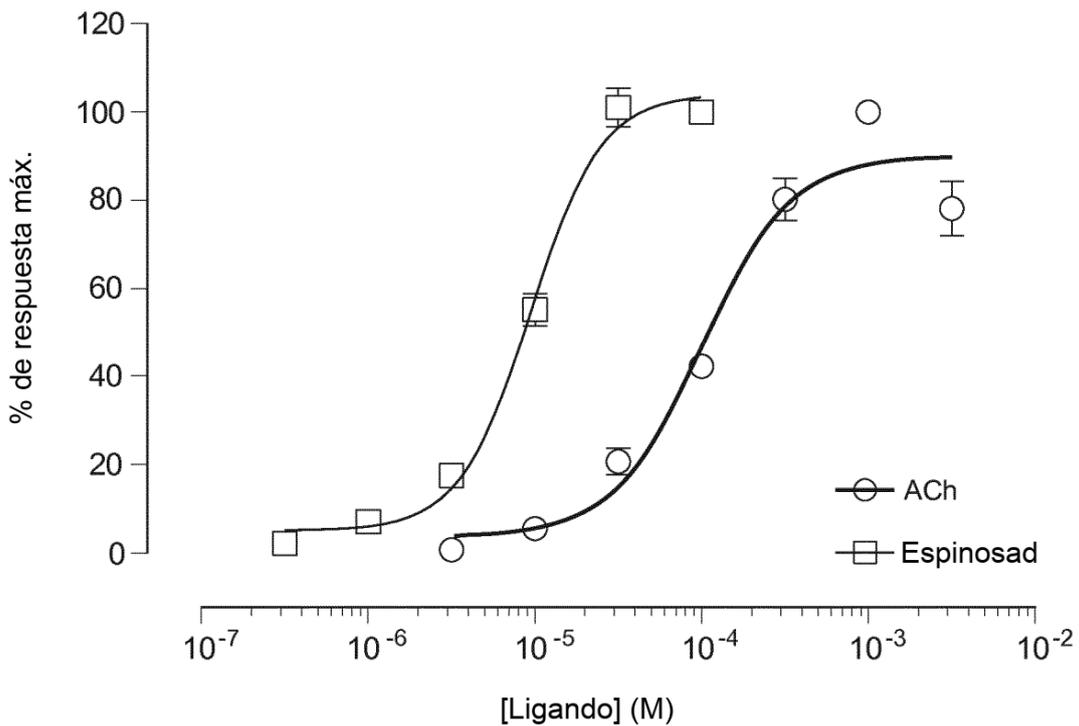


Fig. 10

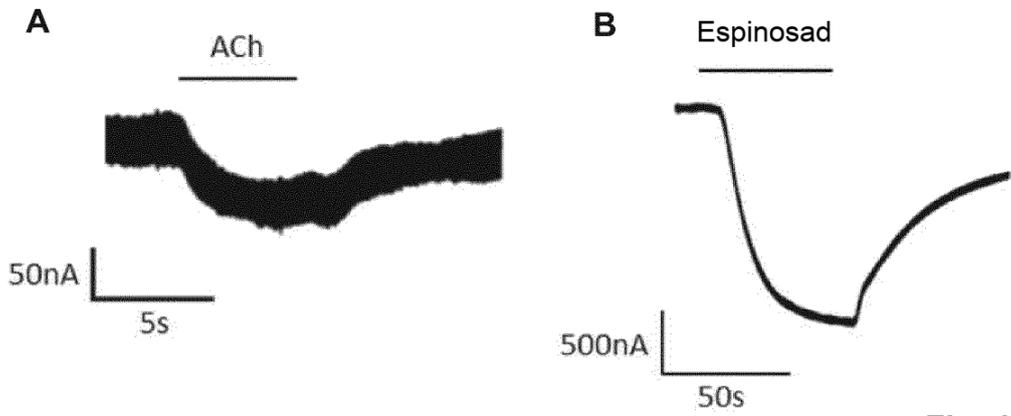


Fig. 11

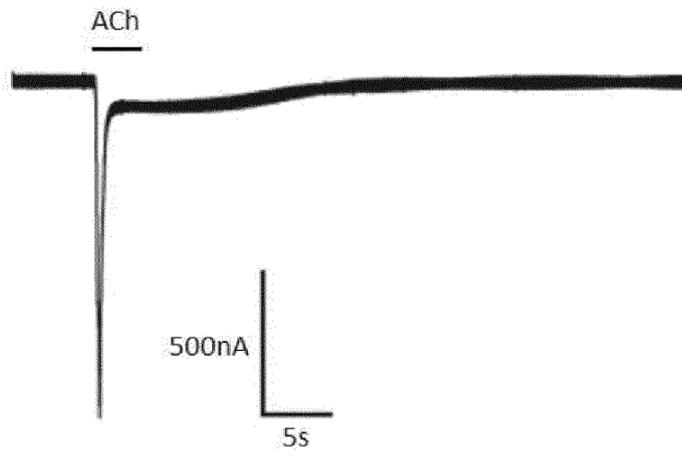


Fig. 12A

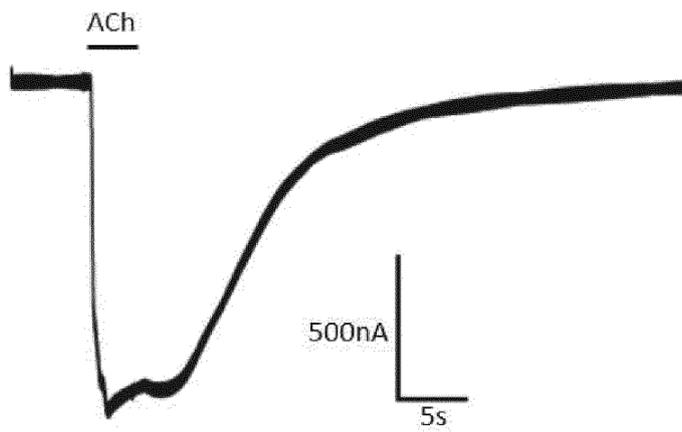


Fig. 12B

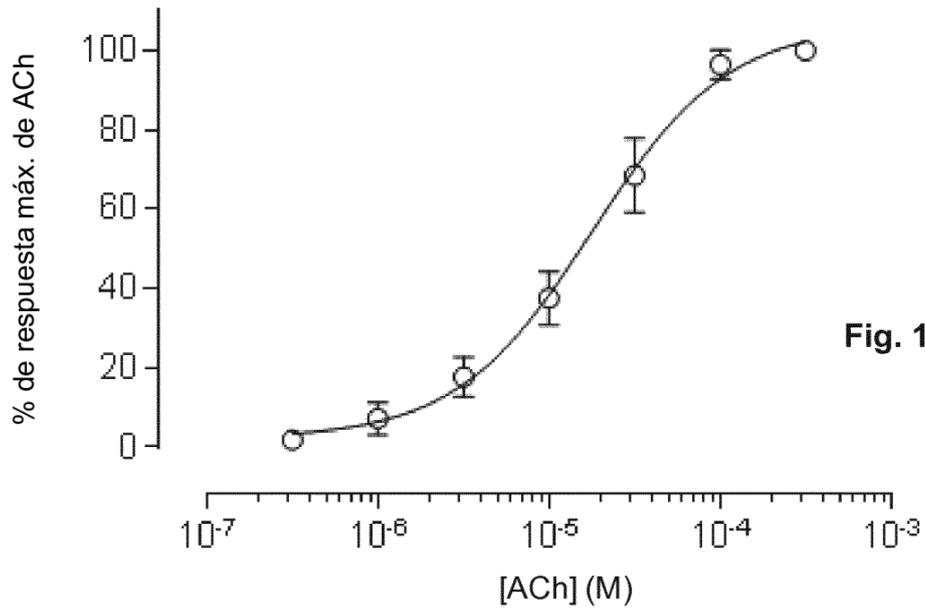


Fig. 13

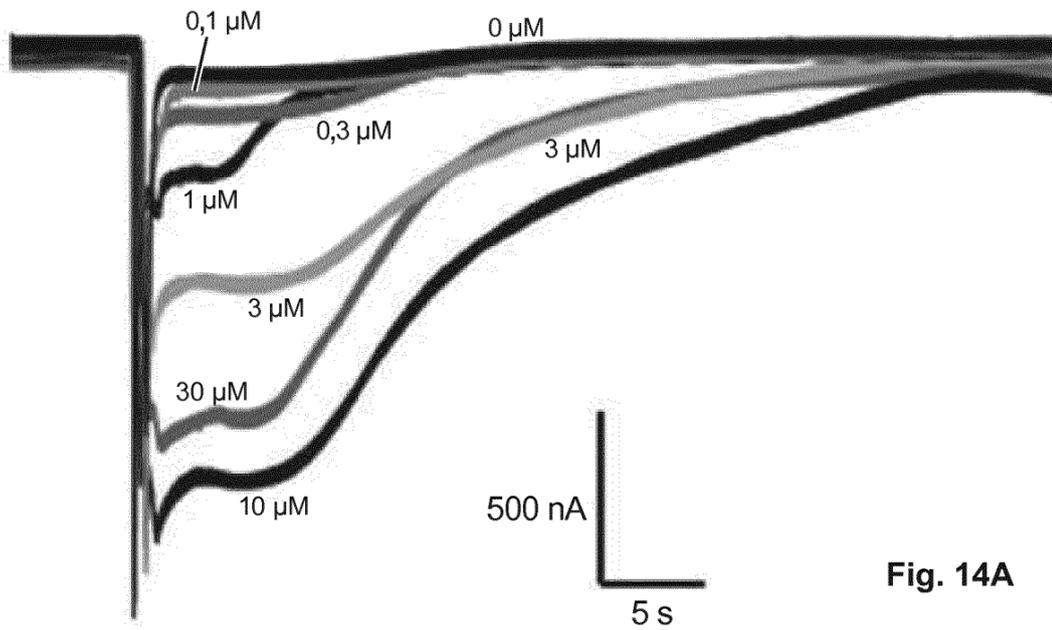
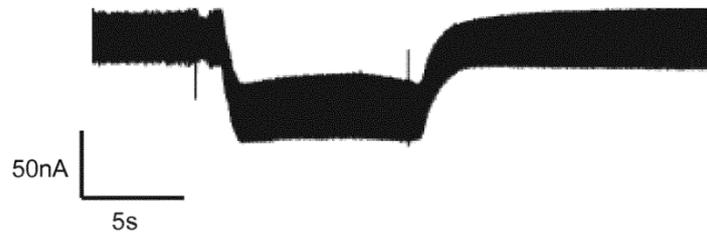
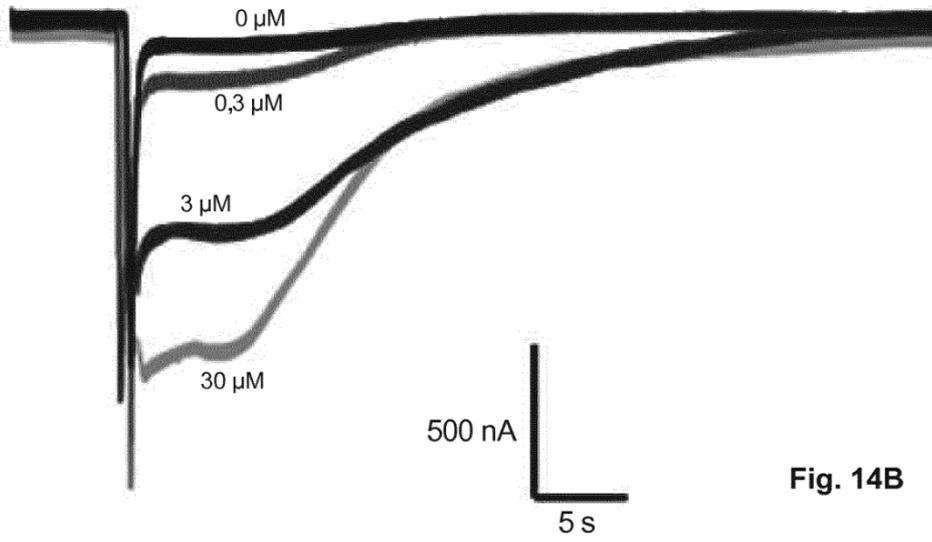


Fig. 14A



ACCACGACGCGGACCATGCGCCCCGGACGCCTGTCTGTGCCGCTGCAGCTAGGCTTCTGCGCC
AACCTGCTGTGGATCGCCGTGCTGCTCACCGCGCCTCAGGACTCTGAACAAGGCGCGCACGAG
CGGCGGCTTCTGGCAGACCTGCTGGCCAAC TACAACACCCTGGAGCGGCCGTGCTCAACGAG
TCGGAGCCGCTCATCCTCAGCTTCGGGCTCACACTGCAGCAGATCATAGACGTCGACGAAAAG
AATCAAATAATAACAACAAACGTGTGGTTAAATCTGGATTGGATAGATGTGAATCTACGTTGG
AACCCAAAAGACTACGGCGGAGTGCAGGACCTGCGTATTCCGCCAAAACAAAATTTGGAAGCCT
GACGTGCTCATGTACAACAGCGCGGACGAAAAGTTTCGACGGCACGTACCCGACCAACGTGGTC
GTGCGGAGCAACGGCAGTTGCAACTACATCCCTCCTGGCATCTTTAAGAGCACGTGCAAGATC
GACATTACGTGGTTCCCTTTTGACGATCAGAAGTGCACCTGAAGTTTCGGCTCCTGGACCTAT
CACGGTTATCAGCTGGACCTTCGTGTCAACAGTGAGGAAGGCGGGGATCTGACTACCTACATT
CCCAATGGCGAGTGGGACCTGATAGGCGTGCCGGGAGTGCGCAACGTTTCGGGAGTATGCCTGC
TGTCCGGAGCCGTACATCGACATCACGTACACCATCCACATCCGGCGGCGCACGCTCTACTAC
GGCTTCAACCTCATCATTCCTGCGTGCTCATCTCGTCCATGACTCTGCTCGGTTTTACGCTG
CCCCCGACACCGGAGAGAGGCTCACCTGGGTGTAACCATTTTGTGTCCCTGACGGTATTC
ATGCTCCAGCTCGCCGAGACCATGCCTCCGACGTCCGATGCTGTCTCCATAATAGGAACTTAT
TTTGCCTGCATCATGATCATGGTTGCCTTTTTCGGTGGTCATGACCGTGGTGGTCTGAAC TAT
CATCACAGAAATCAAGAGACGACCGAAATGCCTGCTTTGATTTCGACGGTGTTCCTGGTGTGG
CTCCCGTGGCTTCTGCGCATGGAGCCTCCGGGCCAGAAGGCGAACAGGCGCAGCCTCTTCCTC
AACAGCAAGATGAAAGAGCTCGAGCTGAAGGAGCGCTCATCGCGGAGTCTGCTGGCCAACGTG
CTGGACATCGACGACGACTTCGGCACGGCCAACAGCGCCGCCGCCGCCGACTGCCACGGG
TCTCGGACCCCGTTCCTGGGCGGTGGCGGGGGCGTCCACGGTGCACGCTTGCCTCCACTCG
TCGCGTGAAC TGAAC TTGATCTTGCGCGAGCTGCGCTTCATCACGAGCCGCATGCGCAAGGAC
GAGCAAGAGCGGGAGGTCGTTGGCGAGTGAAGTTTCGCGGCCATGGTCGTGACCGCTGCTGC
CTCATCATCTTCTCCCTGTTCCACATCATCTCCACCTGCGCCTGCCTCTTCTCGGGCGCCCAT
CTGGTCGCCTAGCGCACCTGCT

Fig. 16

MRPGRLSVPLQLGF CANLLWIAVLLTAPQDSEQGAHERLLADLLANYNTLE
RPVLNESEPLILSFGLTLQ QI IDVDEKN QI ITTNVWLNLDWIDVNLRWNPKD
YGGVQDLRI PPNKIWKPDVLMYNSADEKFDGTYPTNVVRSNGSCNYIPPGI
FKSTCKIDITWFPFDDQKCDLKFSGSWTYHGYQLDLRVNSEE GDLTTYIPNG
EWDLIGVPGVRNVREYACPEPYIDITYTIHIRRRTLYYGFNLIIPCVLISS
MTLLGFLLPPDTGERLTLGVTILLSLTVFMLQLAETMPPTS DAVSIIIGTYFA
CIMIMVAFSVVMTVVVLNYHHRNQETTEMPALIRTVFLVWLPWLLRMEPPGQ
KANRRSLFLNSKMKELELKERSRSLLANVLDIDDDFRTANSAAAAADCHGS
RTPFLGGGGGASTVHACVHSSRELNLILRELRFITSRMRKDEQEREVVGEWK
FAAMVVDRCLIIIFSLFTIIISTCACLFSAPHLVA

Fig. 17