

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 031**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 33/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2014 PCT/EP2014/056248**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14154847**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2014 E 14713130 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2978443**

54 Título: **Vacuna contra garrapatas de Rhipicephalus**

30 Prioridad:

29.03.2013 EP 13161834

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

21.11.2017

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)

Wim de Körverstraat 35

5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

**SCHETTERS, THEODORUS PETRUS MARIA y
JANSEN, THEODORUS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 643 031 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

Vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus*

5 La presente invención se refiere en general a los campos de parasitología e inmunología, y especialmente, a una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus*. En particular, la invención se refiere a una composición que comprende una primera y una segunda proteínas, al uso de dicha composición como una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* y al uso de la primera y la segunda proteínas aisladas para la vacunación de una diana contra garrapatas de *Rhipicephalus*.

10 La infestación por ectoparásitos es una preocupación importante para la salud humana y veterinaria actualmente, ya que tiene importantes implicaciones económicas y de bienestar. Los ectoparásitos son muy diversos, pero las plagas más relevantes son los artrópodos, por ejemplo: insectos tales como moscas y mosquitos, o arácnidos tales como garrapatas y ácaros. El ectoparásito en una o más fases de su desarrollo establece contacto con un hospedador humano o animal para alimentarse en el hospedador, y este puede ser un contacto corto, prolongado y/o repetido. Muchos ectoparásitos, en una o más fases de su desarrollo, se alimentan de la sangre de un hospedador, por lo tanto, se les denomina hematófagos o sanguívoros. Este tipo de parasitismo tiene una serie de efectos negativos que puede variar desde una simple molestia a una causa de muerte. Esto se debe a que el contacto entre el parásito y el hospedador implica varias interacciones mecánicas y biológicas: la perforación de la piel por el ectoparásito puede causar una erupción o una inflamación; el parásito con su mordedura puede inyectar con su saliva una serie de compuestos biológicos para mantener el flujo sanguíneo, suprimir la respuesta inmunitaria y enmascarar la sensación, estas sustancias pueden causar una reacción de hipersensibilidad; el consumo repetido de sangre por miles de ectoparásitos con el tiempo puede hacer que un hospedador se vuelva anémico; y también el parásito puede ser un vector para un patógeno microscópico que puede infectar al hospedador desde las partes bucales del parásito, la saliva o sus heces. El patógeno transmitido puede causar al hospedador una enfermedad que se denomina enfermedad transmitida por artrópodos.

Las consecuencias para el hospedador pueden ser: estrés prolongado, toxicidad inducida por factores del parásito, daño físico al pellejo o a la piel por mordeduras o infecciones secundarias, anemia y/o una infección con una amplia variedad de enfermedad transmitidas, por ejemplo: por bacterias o *Rickettsia*, tales como: *Borrelia*, *Ehrlichia* o *Anaplasma*; por virus tales como: bunyavirus o reovirus, causando: dengue, fiebre amarilla, encefalitis, lengua azul, etc.; o por protozoos y helmintos tales como: *Plasmodium*, *Babesia*, *Trypanosomes*, *Leishmania*, tenia, solitaria, gusanos nematodos, etc. También existe un peligro real de propagación zoonótica de dichas enfermedades de los animales a los seres humanos.

35 Una infestación por ectoparásitos afecta así al bienestar general de un hospedador humano o animal. Para los hospedadores animales de importancia agrícola, esto afecta gravemente a su rendimiento económico, tal como la tasa de conversión del alimento y del crecimiento y la cantidad y calidad de su producción de carne, huevos, leche, lana, pieles y número de crías.

40 Los ectoparásitos artrópodos de importancia veterinaria y zoonótica son las garrapatas del género *Rhipicephalus*. Estas son garrapatas de dorso duro (familia *Ixodidae*) que se alimentan de varios mamíferos, tanto animales salvajes, tales como ciervos, antílopes y varias especies de roedores; así como también ganado doméstico, tal como ganado, caballos, burros, cabras, ovejas, cerdos y perros. Algunas garrapatas de *Rhipicephalus* tienen una preferencia por una especie específica de hospedador, por ejemplo, *Rhipicephalus sanguineus* (la garrapata marón del perro o garrapata de las perreras) con preferencia por los perros. Las más importantes económicamente son las garrapatas de *Rhipicephalus* que se alimentan de bovinos, por ejemplo: *R. appendiculatus* (garrapata marrón de las orejas) y garrapatas del subgénero *Boophilus*, por ejemplo: *R. (Boophilus) microplus* (la garrapata sureña del ganado, que también se conoce con su nombre antiguo: *Boophilus microplus*) y *R. (Boophilus) annulatus* (garrapata norteamericana).

50 Las garrapatas de *Rhipicephalus* aparecen en todo el mundo, pero principalmente en áreas (sub)tropicales. Pueden ser portadores de una amplia variedad de enfermedades, algunas de las cuales son zoonóticas, por ejemplo, *Babesia*, *Theileria*, *Anaplasma*, *Coxiella*, *Borrelia*, *Rickettsia*, *Nairovirus*, etc.

55 Las garrapatas aparecen en variación con circunstancias estacionales o regionales, y tienen distintas fases de ciclo de vida: huevo, larva, ninfa y adulto. Un ciclo completo lleva un promedio de 2-4 semanas, y cada fase muestra características morfológicas específicas del cuerpo de la garrapata, tales como las piezas bucales y el escudo dorsal. Es también típica la movilidad de las garrapatas, que se refleja en el número de veces que una garrapata se adhiere y se separa de su hospedador. Para una revisión, véase Barker y Murrell (2002, Exp. & Appl. Acarol., vol. 28, pág. 55).

60 Al intentar reducir la infestación por garrapatas y sus consecuencias, se han aplicado varias medidas con el tiempo, algunas más exitosas que otras. Lo más eficaz es el uso de fármacos químicos que repelen, destruyen o dañan a las garrapatas, por ejemplo, acaricidas. Estos pueden aplicarse a un hospedador externamente, por ejemplo, como una pulverización, aplicación, o por vía oral o parenteral, y actúan sobre o en el cuerpo del hospedador. Durante el siglo pasado se ha desarrollado una amplia variedad de fármacos acaricidas para este propósito.

65

Un inconveniente principal del uso de dichos antiparasitarios químicos es el desarrollo de resistencia en las garrapatas, lo que hace que estos compuestos sean menos eficaces con el tiempo. Como resultado, a veces es necesario tratar al ganado cada pocas semanas, lo cual es laborioso y costoso. Además se aplican otras preocupaciones, tales como: temor a la toxicidad para el usuario, efectos secundarios para el hospedador, residuos en productos de origen animal (carne, leche, pieles), así como preocupaciones ambientales. Esto se revisa en Otranto y Wall (2008, Med. and Vet. Entomol., vol. 22, pág. 291).

Como alternativa a los antiparasitarios químicos, la vacunación se ha probado durante muchos años, sin embargo con un éxito moderado. Una vacuna de ectoparásitos debe proporcionar una reducción en el número de garrapatas, o en la duración en la que están adheridas o alimentándose del hospedador. Esto también reduciría los efectos secundarios que la infestación por el ectoparásito puede causar a un hospedador, tales como: daño en la piel, anemia, toxicidad o infección con enfermedades transmitidas. Además, esto reduciría la fecundidad de las garrapatas en cuanto al número, el peso y la viabilidad de los huevos que la hembra puede producir, lo que reduce la presión global de infestación para un rebaño y/o en una región geográfica.

La eficacia de una vacuna contra la garrapata se puede expresar en su "efecto atenuador", lo que significa la reducción visual en el nivel de la infestación, normalmente observando menos adultos. Lo más probable es que esto es causado por un efecto letal sobre larvas y ninfas.

El mecanismo de acción de una vacuna contra un ectoparásito hematófago es indirecto: un hospedador de ectoparásito es la diana de una vacunación con un antígeno del ectoparásito, de modo que se desarrollan anticuerpos específicos en la sangre de la diana. El ectoparásito que posteriormente se alimenta de la sangre de un hospedador vacunado, capta de este modo los anticuerpos. Cuando el anticuerpo vacunal procede de una biomolécula esencial del parásito, estos anticuerpos alterarán procesos biológicos esenciales dentro del parásito que daña su crecimiento y reproducción (Willadsen, 2004, Parasitology, vol. 129, pág. S367).

Como los anticuerpos de la sangre ingerida requerirán algún tiempo para tener su efecto sobre el ectoparásito, dicha vacuna no puede impedir el contacto inicial entre un hospedador vacunado y el ectoparásito, al igual que algunos repelentes químicos. Sin embargo, este tipo de vacuna puede ser eficaz contra ectoparásitos que permanecen en el mismo hospedador durante un tiempo (horas, días, semanas) prolongado, tal ocurre con las garrapatas de *Rhipicephalus*.

Las primeras vacunas contra ectoparásitos fueron homogeneizados toscos de parásitos enteros, o de partes específicas del cuerpo. Posteriormente se ensayaron antígenos proteicos más específicos. En su mayoría, estas vacunas se utilizaron como emulsiones de agua en aceite con adyuvante. Estas vacunas utilizaban un antígeno expuesto o un antígeno oculto; un antígeno expuesto es aquel que es "visto" por el sistema inmunitario del hospedador cuando el ectoparásito establece contacto, tal como un antígeno de sus partes bucales o saliva. Un antígeno oculto es un antígeno que es más interno al ectoparásito y por lo tanto no se presenta normalmente al sistema inmunitario del hospedador. Por consiguiente, mientras que la inmunidad frente a un antígeno de parásito expuesto será regularmente reforzada naturalmente por contacto con el ectoparásito; la inmunidad contra un antígeno de parásito oculto requerirá refuerzo artificial.

En las vacunas contra las garrapatas de *Rhipicephalus*, las proteínas relacionadas con el intestino se han ensayado en el pasado. Esto ha llevado al desarrollo de las únicas vacunas de ectoparásitos disponibles en el comercio para su uso veterinario desde los años 90: TickGARD™ (Intervet, Bendigo, Australia) y Gavac™ (Heber Biotec, La Habana, Cuba; Revetmex, México). Estas vacunas son emulsiones de agua en aceite con adyuvante para su uso en bovinos diana. Emplean un antígeno oculto del intestino medio de *R. (Boophilus) microplus*: Bm86, o su homólogo: Bm95, que se producen en un sistema de expresión recombinante (*Escherichia coli*, respectivamente *Pichia pastoris*). Ambas vacunas reducen en cierta medida la viabilidad y propagación de las garrapatas de *R. (Boophilus) microplus*. Por lo tanto, estas vacunas se utilizan principalmente en áreas geográficas donde la infestación por garrapatas de *Rhipicephalus* resistentes a acaricidas es elevada. Para una revisión, véase: De la Fuente *et al.* (2007, Anim. Health Res. Rev., vol. 8, pág. 23).

Bm86 es una glucoproteína que se localiza en el lado luminal del epitelio del intestino medio de las garrapatas *R. (Boophilus) microplus*. Bm86 se describió por primera vez en el documento WO 88/03929. La Bm86 de longitud completa tiene aproximadamente 650 aminoácidos y un Pm aparente de aproximadamente 89 kDa. La proteína tiene una secuencia señal N terminal, una región transmembrana C terminal y diversos dominios similares a EGF (Lee y Opdebeeck, 1994, Int. J. of Paras., vol. 25, pág. 241; Kamau *et al.*, 2011, Insect Mol. Biol., vol. 20, pág. 105). Su función en la biología de las garrapatas se desconoce.

Se supone que los anticuerpos específicos de Bm86 en la sangre ingerida, y tal vez factores de complemento, se unen a la proteína de Bm86 en las células intestinales de la garrapata e inician un proceso que daña el intestino (Kemp *et al.*, 1989, Exp. Appl. Acarol., vol. 7, pág. 43).

Muchas secuencias de aminoácidos de Bm86 y sus homólogos están disponibles al público, por ejemplo, en el GenBank, aunque la denominación que se utiliza no es muy coherente: la proteína homóloga obtenida de otras especies de *Rhipicephalus* distintas de *microplus* puede denominarse proteína Bm86, o proteína similar a Bm86,

o se denomina con su propio código de especie, tal como Rs86 para la proteína homóloga Bm86 obtenida de una garrapata de *R. sanguineus*. En la bibliografía las proteínas homólogas de diferentes especies se denominan a veces 'ortólogos'.

Se han encontrado homólogos de Bm86 en todos los grupos de la familia *Ixodidae*, y sus secuencias de aminoácidos están bastante conservadas; dentro del género *Rhipicephalus*, el nivel de identidad de secuencia de aminoácidos entre los homólogos de Bm86 es de al menos aproximadamente 71 % (Nijhof *et al.*, 2010, *Int. J. for Parasit.*, vol. 40, pág. 1587). Los homólogos de Bm86 aislados de garrapatas de la especie *R. (Boophilus) microplus*, recogidos en todo el mundo (Australia, África, Méjico, América del Sur), comparten un nivel de identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 82 % (Canales *et al.*, 2008, *BMC Biotech.*, vol. 8, doi: 10.1186/1472-6750-8-14). Debido a este alto nivel de conservación, la vacunación con un homólogo de Bm86 de una especie de garrapata de *Rhipicephalus*, también protegerá contra otras garrapatas de *Rhipicephalus*.

Se han descrito epítomos conservados protectores de la proteína Bm86 (Odongo *et al.*, 2007, *Vaccine*, vol. 25, pág. 1287; Kopp *et al.*, 2010, *Vaccine*, vol. 28, pág. 261).

Para mejorar la eficacia de las vacunas de ectoparásitos basadas en Bm86, se han considerado varias posibilidades, solo algunas se han ensayado.

Una opción fue mejorar la formulación de la vacuna existente. Esto se aplicó en TickGARD Plus™ (Intervet, Bendigo, Australia) (Anonymous, 2002, *Aust. Vet. J.*, vol. 80, pág. 394).

Otra opción era utilizar un antígeno de vacuna alternativo, por ejemplo, de una parte diferente de la garrapata, tal como las partes bucales o la hemolinfa. Se han publicado varias listas de posibles antígenos candidato, por ejemplo: Almazan *et al.* (2003, *Vaccine*, vol. 21, pág. 1492-1501); Willadsen (2004, citado anteriormente); De la Fuente y Kocan (2006, *Paras. Immunol.*, vol. 28, pág. 275); Parizi *et al.* (2009, *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, vol. 18, pág. 1); y Almazan *et al.* (2010, *Paras. Res.*, vol. 106, pág. 471).

Otros autores han propuesto emplear combinaciones: ya sea una combinación de quimioterapia y vacunación en una estrategia integrada de control de garrapatas (Otranto & Wall, 2008, citado anteriormente), o combinaciones de antígenos en vacunas multicomponente.

Entre tanto, se han ensayado varias combinaciones de dos antígenos ocultos; aunque en algunos casos se encontró un efecto positivo, no se observó una mejora global del efecto de la vacunación en cuanto a protección adicional. Son ejemplos de combinaciones ensayadas: Bm86 y Bm91 (una carboxipeptidasa de *R. (Boophilus) microplus*) (Willadsen *et al.*, 1996, *Paras. Immunol.*, vol. 18, pág. 241); Bm86 y BMA7 (una glucoproteína similar a mucina) (McKenna *et al.*, 1998, *Paras. Immunol.*, vol. 20, pág. 325); y Bm86 y 5' nucleotidasa (Hope *et al.*, 2010, *Paras. Immunol.*, vol. 32, pág. 135). En un estudio, se ensayó el silenciamiento del ARNm de Rs86 (un homólogo de Bm86) y de la Subolesina, utilizando una estrategia de ARNi (de la Fuente *et al.*, 2006, *Paras. Res.*, vol. 99, pág. 108).

La subolesina, también conocida como 4D8, es una proteína con un Pm aparente de aproximadamente 20 kDa, y dentro del género *Rhipicephalus*, la Subolesina tiene aproximadamente 161 aminoácidos. La función exacta de esta proteína se desconoce, pero se encuentra en diferentes tejidos de una garrapata: las glándulas salivares, el intestino y los tejidos reproductores. Como antígeno oculto, se caracteriza incluso menos que Bm86, aunque parece tener una presencia más amplia entre los artrópodos (De la Fuente *et al.*, 2006, *Vaccine*, vol. 24, pág. 4082). La subolesina tiene una preferencia por una localización nuclear en una célula; esto concuerda con el hecho de que los ortólogos de la Subolesina encontrados en insectos provienen de la familia de las proteínas Akirina, que son factores de transcripción (Galindo *et al.*, 2009, *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 33, pág. 612).

Un gran número de secuencias de aminoácidos de las proteínas Subolesina homólogas están disponibles en GenBank. Comúnmente se las conoce como Subolesina o proteína 4D8, independientemente del origen de la garrapata. Un análisis de proteínas de Subolesina de varias especies de *Rhipicephalus* y de varias áreas geográficas, reveló que estas proteínas están bien conservadas y comparten un nivel de identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 85 % (De la Fuente *et al.*, 2006, *Vaccine*, citado anteriormente).

La función de la Subolesina en una garrapata de *Rhipicephalus* se ha suprimido experimentalmente, ya sea por anticuerpos específicos de un hospedador vacunado con Subolesina, o por silenciamiento de genes mediante una estrategia de ARNi. Esto interfirió significativamente con el crecimiento y desarrollo de la garrapata, tal como su digestión de sangre ingerida, oviposición, muda y supervivencia. La Subolesina se ha utilizado como un antígeno de vacuna, y se ha sugerido para su uso en vacunas de combinación con una o más de una abundancia de candidatos posibles de la vacuna. Para una revisión: De la Fuente *et al.* (2011, *Vet. Path.*, vol. 181, pág. 17). Se ha construido el mapa de los epítomos protectores de la Subolesina (Prudencio *et al.*, 2010, *Vaccine*, vol. 28, pág. 5398).

No obstante, hasta el momento no se ha descrito ninguna vacuna combinada exitosa contras las garrapatas utilizando Subolesina. Es interesante destacar que De la Fuente y sus colaboradores, en sus más recientes tentativas en este campo, han dejado de ensayar vacunas combinadas y han vuelto a utilizar vacunas sencillas de Subolesina o proteína Bm86 y recomiendan combinar dicha vacuna sencilla con otras medidas de control de la garrapata, tales como el uso de acaricidas (Carreon *et al.*, 2012, *Vaccine*, vol. 30, pág. 273).

Es notable que, a pesar de todos los esfuerzos y sugerencias acerca del uso de diferentes antígenos y

combinaciones, los resultados de tres décadas de investigación en vacunas contra garrapatas son, en el mejor de casos, mediocres. Esto lleva al Dr. P. Willadsen, quien fue el creador de TickGARD™ y quien es uno de los científicos principales en este campo, a concluir que: las vacunas contra garrapatas basadas en cócteles de antígeno son a lo sumo una “hipótesis válida” (aunque no probada), pero en la mayoría de los casos, son una “esperanza sin fundamento”. En el supuesto caso de que “dichos cócteles mostrarán una eficacia potenciada”, comentó que “La evidencia experimental para ello, sin embargo, es extremadamente escasa y contradictoria” (Willadsen, 2008, Trends in Paras., vol. 24, pág. 164 - 167).

Por consiguiente, el campo tiene una necesidad urgente de una vacuna más eficaz contra las garrapatas de *Rhipicephalus*. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es superar las desventajas de la técnica anterior, y adaptarse a esta necesidad en el campo proporcionando una vacuna mejorada contra garrapatas de *Rhipicephalus*.

Sorprendentemente, se descubrió que este objetivo podía cumplirse y por consiguiente las desventajas de la técnica anterior podían superarse, utilizando dos antígenos de proteína de garrapatas de *Rhipicephalus*, Bm86 y Subolesina, o sus homólogos o fragmentos inmunogénicos, pero únicamente cuando las dos proteínas se presentan por separado a un sistema inmunitario diana. Cuando las dos proteínas se combinan en una mezcla directa, solo se formaban niveles moderados de anticuerpos, y principalmente contra Bm86. Dicha vacunación era solo parcialmente protectora contra garrapatas de *Rhipicephalus* dispuestas en un hospedador bovino como una infestación de exposición.

Sin embargo, cuando la Bm86 y la Subolesina se presentaban al sistema inmunitario diana simultáneamente, aunque físicamente separadas entre sí, los inventores encontraron que la diana formada altos niveles de anticuerpos contra cada una de las dos proteínas. Estos anticuerpos tenían un efecto combinado sorprendentemente favorable, dando como resultado una fuerte protección inmunitaria del hospedador vacunado frente a una infestación de exposición con garrapatas de *Rhipicephalus*. En algunos casos se observó un efecto de atenuación casi completo.

Este descubrimiento puede ahora plantear un uso ventajoso en una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus*, especialmente de dos maneras: es decir, mediante una sola administración o una administración doble de estas dos proteínas.

Cuando las dos proteínas se aplican en una sola administración, deben formularse de tal manera que permanezcan físicamente separadas entre sí en la composición de vacuna final.

Como alternativa, cuando las dos proteínas se aplican en una administración doble, deben administrarse simultáneamente pero en diferentes lugares del cuerpo, mediante diferentes vías, o mediante diferentes métodos.

Se desconoce por qué las dos proteínas Bm86 y Subolesina, o sus homólogos o fragmentos inmunogénicos deben presentarse por separado al sistema inmunitario de la diana, con el fin de lograr una estimulación suficiente del sistema inmunitario humoral para superar una infestación de garrapatas. Aunque los inventores no quieren estar ligados a ninguna teoría o modelo que pueda explicar estas observaciones, especulan que la causa puede estar en alguna forma de interferencia entre estas dos proteínas, por lo que una está enmascarando a la otra por el sistema inmunitario de la diana.

Por consiguiente, antes de la presente invención, un experto en la materia emplearía una combinación directa de las dos proteínas, que no podría lograr una protección inmunitaria eficaz. Los inventores consideran que esta es la razón por la cual no existe una técnica anterior que describa el uso de una combinación de antígenos de Bm86 y Subolesina en una vacuna de garrapatas, y mucho menos cualquier resultado de vacunación exitosa de dicho uso. En lo que respecta a la aplicación de los dos antígenos de proteína como una sola administración:

En un primer aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una primera y una segunda proteína aislada, en la que la primera proteína aislada, o un homólogo de la misma, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 71 % con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, y en la que la segunda proteína aislada es una proteína de Subolesina, o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 96 % con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2, y en la que las dos proteínas están físicamente separadas entre sí.

Tanto la primera como la segunda proteína aislada de la composición según la invención, son antígenos proteicos y son capaces de inducir una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, una composición según la invención es una composición antigénica. Una composición según la invención puede utilizarse ventajosamente para la producción de una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus*.

La expresión “que comprende” (así como variaciones tales como “comprende”, “comprenden” y “comprendido(a)”) como se usa en el presente documento, se refiere a todos los elementos, y en cualquier posible combinación concebible para la invención, que está cubiertos por, o incluidos en, una sección, párrafo, reivindicación, etc., del texto en el que se utiliza esta expresión, incluso si dichos elementos o combinaciones no se enumeran explícitamente; y no se refiere a la exclusión de ninguno de dicho elemento (o elementos) o combinaciones. Por

consiguiente, cualquiera de dicha sección, párrafo, reivindicación, etc., del texto, también puede referirse a una o más realizaciones en las que la expresión “que comprende” (o sus variaciones) se sustituye por expresiones tales como “consiste en”, “que consiste en” o “que consiste esencialmente en”.

5 Para la invención, las indicaciones “primera” y “segunda” se usan solo para facilitar la referencia, y no para indicar ningún orden numérico o dependencia.

El término “aislado” debe interpretarse como: aislado de su contexto natural, por acción deliberada o intervención humana, por ejemplo, mediante un procedimiento *in vitro* para la purificación bioquímica.

10 Para la invención, una “proteína” se refiere a una cadena molecular de aminoácidos. Una proteína no tiene una longitud, estructura o forma específica y puede, si se requiere, modificarse *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, por glucosilación, amidación, carboxilación, fosforilación, pegilación o cambios en el plegamiento espacial. Una proteína puede ser una proteína nativa o madura, o una pre- o pro- proteína, o una parte de una proteína. Una proteína puede ser de origen biológico o sintético. Entre otras cosas, los polipéptidos y los péptidos, se incluyen dentro de la definición de proteína.

15 La “identidad de secuencia de aminoácidos” es una manera muy conocida de indicar la relación evolutiva entre dos proteínas. Está indicada por el porcentaje de aminoácidos que son idénticos cuando se comparan posiciones correspondientes entre dos secuencias de aminoácidos. Dicho alineamiento se realiza convenientemente utilizando un programa informático, tal como los programas Blast™ o ClustalW™ disponibles al público, utilizando parámetros predeterminados. Normalmente estos programas optimizan el alineamiento de dos secuencias y muestran la región de superposición, con el número y el porcentaje de emparejamientos idénticos entre aminoácidos. En consecuencia, el área de solapamiento encontrada puede tener la misma longitud que la de la SEQ ID NO: 1 o 2, o menor, dependiendo del tamaño de la secuencia de la proteína con la que se compara la SEQ ID NO: 1 o 2. Para la invención, los porcentajes indicados de identidad de secuencia de aminoácidos, se basan en una comparación con la longitud completa de la SEQ ID NO: 1 o 2.

20 Para la invención, la SEQ ID NO: 1 representa la secuencia parcial de aminoácidos de una proteína Bm86 identificada en una garrapata R. (*Boophilus*) *microplus* de Méjico. La secuencia completa de aminoácidos de esta proteína Bm86 es idéntica a una que está representada en GenBank con el número de registro: ADQ19685, para un aislado de Texas (Estados Unidos). La SEQ ID NO: 1 tiene solo 608 aminoácidos, ya que faltan los 20 aminoácidos N terminales de la secuencia señal nativa de la proteína, así como los 22 aminoácidos C terminales de su región transmembrana. Esta forma truncada de la proteína Bm86 es inmunoprotectora y puede producirse convenientemente *in vitro*, por ejemplo, en un sistema de expresión recombinante.

25 Para la invención, la proteína Bm86 de SEQ ID NO: 1 sirve como una referencia para homólogos de proteína Bm86 que pueden utilizarse igualmente para la invención. Estas proteínas pueden identificarse por su porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

30 Por lo tanto, los homólogos de Bm86 son proteínas basadas en, o procedentes de, proteínas de diferentes especies de *Rhipicephalus* y tienen un nivel de homología de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 1 de al menos 71 % en la región de superposición. Esto puede determinarse mediante el alineamiento de secuencias de aminoácidos sobre toda la longitud de SEQ ID NO: 1, por ejemplo, con proteínas en bases de datos públicas que tienen una longitud de al menos 608 aminoácidos. Por ejemplo, alineando la SEQ ID NO: 1 y la “glucoproteína de superficie celular intestinal” de *R. appendiculatus*, disponible en Genbank con el número de referencia: ADA55445.

35 Son homólogos relacionados más cercanos de Bm86 proteínas de garrapatas del subgénero *Boophilus*. Estos tienen, generalmente, una identidad de secuencia de aminoácidos con la longitud completa de SEQ ID NO: 1 de al menos 82 %, por ejemplo, cuando se alinea la SEQ ID NO: 1 con la “proteína similar a BD86” de *R. decoloratus*, disponible en el Genbank con el n.º de referencia: ABY58970.

40 Son homólogos relacionados aún más cercanos de Bm86 proteínas con secuencias de aminoácidos basadas en, o procedentes de, garrapatas de la especie *R. (Boophilus) microplus*. Estos generalmente tienen una identidad de secuencia de aminoácidos con toda la longitud de SEQ ID NO: 1 de al menos 95 %, por ejemplo, cuando se alinea la SEQ ID NO: 1 con la ‘glucoproteína Bm86’ de *R. microplus*, disponible en Genbank con el n.º de referencia: ADQ19687.

45 Por lo tanto, para la invención, la primera proteína aislada es una proteína Bm86, o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 de al menos 71 %.

50 En una realización preferida, la primera proteína aislada para la invención es una proteína Bm86, o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 de al menos 82 %.

55 En una realización más preferida, la primera proteína aislada para la invención es una proteína Bm86, o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de

aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 de al menos 95 %.

5 En una realización preferida de la composición según la invención, la primera proteína aislada es una proteína Bm86, o un homólogo de la misma, y tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 de al menos 71, 73, 75, 80, 82, 85, 87, 90, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 99 o incluso de 100 %, en ese orden de preferencia.

En una realización preferida adicional, la primera proteína aislada de la composición según la invención es una proteína BM86 o un homólogo de la misma.

10 De manera similar, la SEQ ID NO: 2 representa la secuencia parcial de aminoácidos de una proteína Subolesina (4D8) identificada en una garrapata *R. (Boophilus) microplus* de Méjico. La SEQ ID NO: 2 está disponible en Genbank con el número de referencia: ABA62327. La SEQ ID NO: 2 tiene 147 aminoácidos, ya que falta una sección C terminal de la proteína Subolesina nativa, que no fue relevante para su inmunogenicidad. Esta forma truncada de la proteína Subolesina es inmunoprotectora y puede producirse convenientemente *in vitro*, por ejemplo, en un sistema de expresión recombinante.

20 Para la invención la proteína Subolesina de SEQ ID NO: 2 sirve como una referencia para homólogos de la proteína Subolesina que también pueden utilizarse para la invención. Estas proteínas pueden identificarse por su porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

25 Se encontró que las proteínas Subolesina estaban mucho más conservadas que las proteínas Bm86, y específicamente la parte de Subolesina que está en la SEQ ID NO: 2 está muy conservada. Por lo tanto, los homólogos de Subolesina son proteínas basadas en, o procedentes de, proteínas de diferentes especies de *Rhipicephalus* y tienen un nivel de homología de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 2 de al menos 96 % en la región de superposición. Esto puede determinarse mediante el alineamiento de secuencias de aminoácidos sobre toda la longitud de SEQ ID NO: 2, por ejemplo, con proteínas en bases de datos públicas que tienen una longitud de al menos 147 aminoácidos. Por ejemplo, el alineamiento de la SEQ ID NO: 2 y el 'antígeno protector 4D8' de *R. sanguineus*, disponible en GenBank con el n.º de referencia: ABA62332.

30 Son homólogos relacionados incluso más cercanos de Subolesina, proteínas con secuencias de aminoácidos basadas en, o procedentes de, proteínas que se originan de garrapatas del subgénero *Boophilus* de *Rhipicephalus*, o incluso de garrapatas de la especie *R. (Boophilus) microplus*. Ambas tienen generalmente una identidad de secuencia de aminoácidos con toda la longitud de la SEQ ID NO: 2 de al menos 99 %, por ejemplo cuando se alinea la SEQ ID NO: 2 con la Subolesina de *R. microplus* que está disponible en GenBank con el n.º de referencia: AFH57342.

35 Por lo tanto, para la invención, la segunda proteína aislada es una proteína Subolesina, o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 2 de al menos 96 %.

40 En una realización preferida, la segunda proteína aislada para la invención es una proteína Subolesina, o un homólogo de la misma, que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 2 de al menos 99 %.

45 En una realización preferida de la composición según la invención, la segunda proteína aislada es una proteína Subolesina, o un homólogo de la misma, y tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 2 de al menos 96, 97, 98, 99, o incluso de 100 %, en ese orden de preferencia.

En una realización adicional preferida, la segunda proteína aislada de la composición según la invención es una proteína Subolesina o un homólogo de la misma.

50 Para la invención las garrapatas del género "*Rhipicephalus*", el subgénero '*Boophilus*', o la especie '*microplus*', se refieren a garrapatas que actualmente se clasifican dentro de los grupos taxonómicos con esos nombres. Esto incluye también garrapatas que se subclasifican de cualquier manera de los mismos, por ejemplo, como una subespecie, cepa, aislado, genotipo, variante o subtipo y similares. Dichas garrapatas compartirán los rasgos característicos de sus miembros del grupo taxonómico, tales como sus características morfológicas, genómicas y bioquímicas, así como sus características biológicas, tales como el comportamiento fisiológico, inmunológico o parasitario. Normalmente, la clasificación de las garrapatas se basa en microscopía (electrónica) y en secuenciación selectiva de nucleótidos o PCR de marcadores moleculares, como se sabe en el campo.

60 Para un experto en la materia será obvio que aunque las garrapatas, que son el objeto de la presente invención, se clasifican actualmente en este género, subgénero o especie, se trata una clasificación taxonómica que podría estar sujeta a cambios a medida que nuevos conocimientos conducen a la reclasificación en un grupo taxonómico nuevo o diferente. Esta posibilidad ya es obvia a partir de la reciente reclasificación filogenética del género *Boophilus* a un subgénero dentro de *Rhipicephalus* (Barker y Murrell, 2002, Exp. Appl. Acarol., vol. 28, pág. 55). Sin embargo, como esto no cambia el ectoparásito implicado o su repertorio de proteínas, sino solo su nombre científico o clasificación, dichas garrapatas reclasificadas permanecen dentro del alcance de la invención.

Las garrapatas preferidas de *Rhipicephalus* para proporcionar (al menos una de) la primera y la segunda proteína aislada de la composición según la invención, son especies de garrapatas de *Rhipicephalus* que infestan a animales de importancia veterinaria, tales como ganado o animales de compañía. Más preferidas son las especies de garrapatas del género *Rhipicephalus*, específicamente las especies: *sanguineus*, *evertsi*, *appendiculatus*, *annulatus*, *australis*, *decoloratus*, *geigy*, *kohlsi* y *microplus*.

Son más preferidas las especies de garrapatas del subgénero *Boophilus* de *Rhipicephalus*, seleccionadas, por ejemplo, de las especies de *R. (Boophilus)*: *annulatus*, *australis*, *decoloratus*, *geigy*, *kohlsi* y *microplus*.
Son las más preferidas las garrapatas de la especie *R. (Boophilus) microplus*.

Por lo tanto, en una realización preferida, la primera y la segunda proteína aislada de la composición según la invención, proceden de, o se basan en, una proteína de una especie de garrapatas del subgénero *Boophilus* de *Rhipicephalus*.

En una realización cada una de la primera y la segunda proteína aislada de la composición según la invención, procede de una especie de garrapata de *Rhipicephalus* diferente.

Por ejemplo, la primera proteína, la proteína Bm86 o un homólogo de la misma, puede proceder de *R. (Boophilus) microplus* y la segunda proteína, la Subolesina o un homólogo de la misma, puede proceder de *R. sanguineus*. Dicha combinación de antígenos puede proporcionar a una vacuna procedente de la misma una protección amplia contra diversas especies de garrapatas de *Rhipicephalus*.

De manera similar, cada una de las dos proteínas puede proceder de un aislado de garrapata de *R. (Boophilus) microplus* diferente.

Por lo tanto, en una realización preferida, cada una de la primera y la segunda proteína aislada de la composición según la invención, procede o se basa en un aislado de garrapata de *R. (Boophilus) microplus* diferente.

En una realización preferida de la composición según la invención, la primera proteína aislada es una proteína Bm86 o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 82 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y/o la segunda proteína aislada es una proteína Subolesina, o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 96 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En una realización más preferida de la composición según la invención, la primera proteína aislada es una proteína Bm86, o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 95 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y/o la segunda proteína aislada es una proteína Subolesina, o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 99 % con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Para la invención, medio "físicamente separado" significa: comprendido en entidades físicas separadas. Para la primera y la segunda proteína aislada de la composición según la invención, esto significa que pueden estar comprendidas en soluciones separadas, y/o comprendidas en, o sobre, vehículos farmacéuticos separados.

En realizaciones de las soluciones separadas, una solución es preferentemente líquida, y las soluciones separadas pueden estar comprendidas en uno o varios envases. Por ejemplo una composición según la invención puede ser una emulsión que comprende las soluciones separadas como fases acuosas separadas.

Por lo tanto, en una realización preferida, la composición según la invención es una emulsión, caracterizada por que la primera y la segunda proteínas, como se describe para la invención, están comprendidas en fases acuosas separadas.

Una "emulsión" para la invención es un sistema líquido coloidal que comprende dos o más fases, una de las cuales es continua, y la otra se dispersa en la fase continua; la dispersión es normalmente vesículas de tamaño hasta micrométrico o incluso nanométrico.

Existen varias realizaciones ventajosas que tienen las dos proteínas en fases acuosas separadas, por ejemplo: en una emulsión de agua en aceite, en la que las dos proteínas están comprendidas en fases acuosas separadas que están ambas dispersas dentro de una fase oleaginosa circundante, o: en una emulsión de agua en aceite en agua, en las que cada una de las fases acuosa externa e interna comprenden una de las dos proteínas, y están separadas por una fase oleaginosa.

Como alternativa, las dos proteínas pueden separarse utilizando microvesículas tales como ISCOM, micelas o

liposomas, que comprenden una de las proteínas, y se dispersan en una fase acuosa continua que comprende la otra proteína.

5 Para realizaciones relacionadas con vehículos farmacéuticos separados, se dispone de varios compuestos y de estructuras macromoleculares que pueden utilizarse para capturar una u otra de las dos proteínas, y de esta manera, presentarlas por separado al sistema inmunitario de una diana tras la vacunación.

10 Todas estas realizaciones están bien dentro del alcance de un experto en la técnica, y todas pueden ponerse en práctica utilizando tan solo técnicas habituales y materiales convencionales. Por ejemplo, los métodos y materiales para preparar dichas emulsiones son muy conocidos en la técnica y se describen por ejemplo en regulaciones gubernamentales tales como la Farmacopea, y en manuales muy conocidos tales como: "Veterinary vaccinology" (P. Pastoret *et al.* ed., 1997, Elsevier, Ámsterdam, ISBN: 0444819681), y: "Remington: the science and practice of pharmacy" (2000, Lippincot, USA, ISBN: 683306472). En la sección de Ejemplos se describen detalles y ejemplos de trabajo.

15 Dichas emulsiones se forman y estabilizan normalmente utilizando uno o más compuestos activos en superficie o tensioactivos seleccionados, tales como, emulsionantes, solubilizantes, anfífilos y detergentes, o un compuesto que comprende partículas coloidales. Son ejemplos bien conocidos de tensioactivos, los compuestos de las familias: Span™, Tween™ y Arlacel™. Seleccionando un tensioactivo con un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB, *hydrophilic-lipophilic balance*) deseado, pueden formarse las diferentes fases de una emulsión, y permanecer estable, de modo que la emulsión no se 'degrade', incluso cuando se conserve durante un tiempo prologando y a temperaturas variables.

20 La fase acuosa puede estar basada en agua purificada, tal como agua para inyección, y puede comprender sales y/o tampones. La fase oleaginosa puede estar basada en cualquier aceite farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, aceites minerales tales como Bayol™, Markol™, Montanide™ o aceite ligero de parafina; aceites animales tales como aceite de pescado, aceite de hígado de bacalao, pristano, escualeno o escualano; aceites vegetales tales como aceite de soja, aceite de cacahuete, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón o aceite de girasol; o aceites semisintéticos, tales como aceite de Migliol, Cetiol o Miritol.

25 También están disponibles en el comercio mezclas, listas para su uso, de una fase oleaginosa con un emulsionante, que solo requieren mezclarse con un antígeno en una fase acuosa. Son ejemplos Montanide ISA 50V2 y Montanide ISA 206 V (Seppic); estos comprenden un aceite mineral inyectable de alto grado y un emulsionante obtenido a partir de manitol y de ácido oleico purificado de origen vegetal.

30 Por lo tanto, en una realización preferida de la composición según la invención, la composición es una emulsión de agua en aceite que comprende una fase oleaginosa continua y al menos dos fases acuosas separadas, en la que una de las fases acuosas comprende la primera proteína aislada como se describe para la invención, y otra fase acuosa comprende la segunda proteína aislada como se describe para la invención.

35 Una "emulsión de agua en aceite (*w/o*, *water-in-oil*)" es muy conocida en la técnica, y se refiere a una composición que comprende dos fases líquidas, una dispersa en la otra; en este caso: la fase acuosa está dispersa en la fase oleaginosa. Se conocen diversas opciones para preparar dicha emulsión. Para la invención no es crítico el método que se utilice, siempre que en la emulsión resultante la primera y la segunda proteína aislada de la composición según la invención, permanezcan estables físicamente separadas. Como ejemplo, pueden prepararse dos emulsiones de *w/o* separadas, comprendiendo una la primera proteína y la otra la segunda proteína, que después pueden combinarse, cuidadosamente, de manera que se forma una fase oleaginosa continua que comprende las dos fases acuosas diferentes y separadas.

40 En otra realización preferida de la composición según la invención, la composición es una emulsión de agua en aceite en agua, que comprende una fase acuosa externa continua, que comprende una fase oleaginosa, cuya fase oleaginosa comprende al menos una fase acuosa interna, y en la que una proteína seleccionada de la primera y la segunda proteína aislada como se describe para la invención, está comprendida en la fase acuosa externa, y la otra proteína de la primera y la segunda proteína aislada como se describe para la invención, está comprendida en una fase acuosa interna.

45 Una "emulsión de agua en aceite en agua (*w/o/w*, *water-in-oil-in water*)" es muy conocida en la técnica, y se refiere a una composición que comprende tres fases líquidas, dispersas entre sí; en este caso: una fase acuosa se dispersa en la fase oleaginosa, cuya fase oleaginosa a su vez se dispersa en una fase acuosa.

50 De nuevo hay varias opciones para preparar dicha emulsión. El método utilizado no es crítico, siempre y cuando en la emulsión resultante ambas fases acuosas, que comprenden cada una de ellas una de las dos proteínas de la composición según la invención, permanezcan separadas. Por ejemplo, una emulsión de *w/o* puede prepararse utilizando una fase acuosa que comprenda una de las dos proteínas. Esta puede después mezclarse, cuidadosamente, con una solución acuosa que comprenda el alterno de las dos proteínas. En las condiciones adecuadas se formará una emulsión *w/o/w*, en la que las dos proteínas están comprendidas en fases acuosas separadas que están divididas por una fase oleaginosa. Una vez más, un experto en la materia podrá seleccionar los compuestos y las condiciones necesarios para hacer que la emulsión sea suficientemente estable.

En otra realización aún preferida de la composición según la invención, cada una de la primera y la segunda proteína aislada como se describe para la invención, están comprendidas por vehículos farmacéuticos separados.

5 Para la invención “comprendida en vehículos farmacéuticos separados” se refiere a la situación en la que cada una de la primera y la segunda proteína aislada de la composición según la invención, está unida a un vehículo; la unión debe ser de tal manera que la proteína no se desprenda fácilmente, ya que no determinaría su presentación separada al sistema inmunitario diana.

10 La expresión “comprendida en” indica que la proteína se puede unir al, o sobre el, vehículo farmacéutico en diferentes conformaciones, tales como sobre la superficie del vehículo, o más internamente, tal como capturada en una estructura en forma de rejilla o gel, o en cavidades macroporosas del vehículo. La unión es por enlace no covalente, y normalmente resultará de una combinación de interacciones atómicas e iónicas tales como fuerzas electrostáticas y de Van der Waals, interacciones hidrófobas y enlaces de hidrógeno.

15 El término “separado(a)” tiene como objetivo indicar que un tipo, un lote o una entidad de transportador debe comprender solamente una de las dos proteínas, con el fin de permitir que las proteínas se presenten al sistema inmunitario de la diana por separado. No obstante, el vehículo que se utiliza para cada una de las proteínas puede ser igual o diferente, y el vehículo (o vehículos) cargado puede incluso estar en la misma fase acuosa. Esto se ilustra con ejemplos más adelante.

20 Se conocen diversos candidatos para un vehículo farmacéutico para su uso en la invención. Son ejemplos geles farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, de un compuesto de alumbre, tal como un gel de hidróxido de alumbre, o un gel de fosfato de alumbre, o un gel de metilcelulosa, por ejemplo, Methocel (Dow). Un polímero de hidrato de carbono iónico de origen natural que es capaz de formar un gel al entrar en contacto con fluidos corporales, es por ejemplo un polímero de GelSite™.

25 Como alternativa, un vehículo puede ser una estructura macromolecular: una ‘estructura macromolecular’ para su uso en la invención se refiere a estructuras moleculares relativamente grandes tales como estructuras poliméricas o particuladas, que tienen un tamaño considerable, por ejemplo, un tamaño mayor de 1000 Da, o mayor de 100 nm. Son ejemplos muy conocidos: ISCOM™, quitosano, dendrómero, alginato, partícula de látex, partícula de oro, o una partícula de polímero sintético, todos muy conocidos en la técnica.

30 Por lo tanto, en una realización preferida de la composición según la invención, al menos uno de los vehículos farmacéuticos es un compuesto de alumbre o una estructura macromolecular.

35 Un ejemplo de una composición según la invención en la que la primera y segunda proteína aislada ‘están comprendidas por vehículos farmacéuticos separados’ se obtiene cuando un vehículo macromolecular se añade a cada uno de los dos envases, comprendiendo cada envase una solución con una de las dos proteínas. Después de una incubación adecuada, las proteínas se capturan en, o sobre, el vehículo. Los vehículos “cargados” pueden, por ejemplo, lavarse para eliminar la proteína no unida, y pueden combinarse en una solución, que después es una composición según la invención. De esta manera, las dos proteínas, incluso cuando aparecen en la misma fase acuosa, se presentan todavía por separado al sistema inmunitario de la diana después de la vacunación. En este ejemplo el vehículo es el mismo para las dos proteínas, pero una alternativa es utilizar un vehículo diferente para cada una de las proteínas. Está dentro de las capacidades habituales de un experto en la técnica, hacer y ensayar variaciones sobre este concepto, para optimizar aún más el resultado de dicha composición.

45 Otra variación que está dentro del alcance de la invención, es la combinación de una emulsión y un vehículo farmacéutico. Esto puede aplicarse, por ejemplo, en una realización en la que una de la primera o la segunda proteína aislada para la invención, está comprendida en un vehículo farmacéutico, por ejemplo, un gel de alumbre, y el gel de alumbre cargado con proteína se emulsiona con una fase acuosa en una emulsión de agua en aceite.

50 Ventajosamente, esto puede proporcionar una estimulación extra de una respuesta inmunitaria de la diana contra las proteínas.

55 Como se ha descrito, una composición según la invención puede adoptar varias formas, y pueden prepararse de varias maneras.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la preparación de una composición según la invención, que comprende las etapas de:

- 60
- preparar soluciones o vehículos farmacéuticos que comprendan ya sea la primera o la segunda proteína aislada como se describe para la invención, y
 - combinar estas soluciones y/o vehículos farmacéuticos en una composición, de manera que la composición comprenda tanto la primera como la segunda proteína aislada como se describe para la invención.

65

Según el método de la invención, la etapa de combinar las soluciones o vehículos en una composición, puede realizarse de diversas maneras. Por ejemplo, puede realizarse (mucho tiempo) antes de la administración, en un laboratorio o en una planta de preparación farmacéutica. Esta forma de combinación proporciona un control óptimo sobre la calidad y la seguridad de la combinación resultante.

5 Como alternativa, la combinación puede realizarse poco antes de la administración, mezclando la(s) solución(es) y/o el (los) vehículo(s), o las emulsiones preparadas que comprenden la(s) solución(es) y/o el (los) vehículo(s). Esto puede realizarse convenientemente la persona que administra la vacuna al lado del ser humano o animal que se va a vacunar; lo que se denomina mezcla 'en el lugar'. Por ejemplo, esto comprende la mezcla manual de volúmenes iguales de dos emulsiones de agua en aceite w/o, conteniendo cada una de ellas un antígeno diferente en su fase acuosa. Esto produce una emulsión de w/o con una fase oleaginosa continua y una fase acuosa dispersa, que tiene gotitas en fase acuosa que contienen antígenos diferentes y separados, por ejemplo Bm86 y Subolesina, sus homólogos, o fragmentos inmunogénicos. Este método proporciona flexibilidad óptima para la selección de soluciones a combinar.

15 Por lo tanto, en una realización del método según la invención, el método comprende las etapas de:

- preparar emulsiones separadas que comprendan ya sea la primera o la segunda proteína aislada como se describe para la invención, y
- 20 - mezclar estas emulsiones separadas en una emulsión combinada.

La "mezcla" se realiza mezclando a baja intensidad, para no alterar las emulsiones que van a mezclarse. Por ejemplo, esto puede realizarse mezclando a baja velocidad, por ejemplo, a menos de 1000 rpm, o mezclando o agitando a mano.

25 En una realización preferida las emulsiones son emulsiones de agua en aceite, w/o, ya que dichas emulsiones son las más adecuadas para mezclar en el lugar.

30 Como una alternativa adicional para la etapa de combinar las soluciones o vehículos en una composición, la combinación puede realizarse en el momento de la administración, mediante aplicación utilizando un dispositivo de inyección de punto único que proporcione la mezcla tras la inoculación.

35 En esta realización, el dispositivo de inyección de punto único tiene la primera y la segunda proteína aislada como se describe para la invención, en soluciones separadas en cámaras o envases separados. Dichos dispositivos de inyección de punto único son muy conocidos en la técnica y pueden ser, por ejemplo, un inyector electromecánico con una sola aguja que se alimenta de diferentes envases, o puede ser una jeringa de combinación o doble con cámaras separadas que se corresponden a través de una junta conductora con una sola boquilla a la que se puede fijar una aguja. Combinando las soluciones separadas en la junta conductora, se produce la mezcla durante la inyección en un solo lugar. Consecuentemente, esto se califica como una administración sencilla de la composición o vacuna según la invención, e incorpora el método de la invención.

40 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición que puede obtenerse mediante un método según la invención, en el que la composición comprende la primera y la segunda proteína aislada como se describe para la invención, físicamente separadas entre sí.

45 La preparación de soluciones para uso en el método según la invención puede realizarse de diversas maneras, todas bien conocidas por un experto en la materia. El método exacto de preparación tampoco es crítico siempre que la composición resultante permita obtener los efectos ventajosos de la invención.

50 Por ejemplo, una solución para la invención puede ser una fase acuosa que comprende una de la primera o segunda proteína aislada como se describe para la invención, normalmente con un tampón y/o estabilizador apropiado.

Además, una solución para la invención puede ser una emulsión que comprende dicha fase acuosa que comprende una de la primera o la segunda proteína aislada como se describe para la invención, y una fase oleaginosa, por ejemplo, un aceite mineral ligero.

55 La emulsificación estándar de una emulsión de w/o basada en aceite mineral ligero, se realiza normalmente por emulsificación de una fase acuosa que contiene un antígeno en una fase oleaginosa, en condiciones de alta cizalla. Convenientemente, puede utilizarse un mezclador de alta velocidad, por ejemplo, de Silverson, para mezclar el agua en el aceite, por ejemplo, a 4000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. La velocidad de la mezcla de las dos fases líquidas y los ajustes de potencia y rpm del mezclador se controlan y optimizan para el volumen y el tipo de emulsión que se va a preparar. Durante el mezclado se vigila la temperatura de modo que no exceda un valor máximo, por ejemplo, 40 °C. Convenientemente, dichas emulsiones pueden basarse en ingredientes comerciales, tales como Montanide™ (Seppic), y prepararse según las instrucciones del proveedor.

65 Para la emulgación y estabilización de las fases separadas, se utilizan tensioactivos apropiados, por ejemplo, compuestos de las familias Span™, Tween™ o Arlacel™, para controlar el tamaño y la estabilidad de las gotitas.

Los tensioactivos se usan normalmente entre 0,1 y 10 % p/v. Normalmente, a la fase oleaginosa se le añade un tensioactivo con un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB, *hydrophilic-lipophilic balance*) bajo (por ejemplo, un Span™) y a la fase acuosa se le añade un tensioactivo con un valor HLB alto (por ejemplo, un Tween™). La relación de agua con respecto a aceite total es preferentemente entre 30:70 y 70:30, y más preferentemente de aproximadamente 50:50, para tener una emulsión inyectable con una viscosidad aceptable.

También pueden prepararse emulsiones más complejas, por ejemplo, puede prepararse una emulsión w/o/w, emulsionando primero, por ejemplo, una fase acuosa (con antígeno) en una fase oleaginosa utilizando alta cizalla, y posteriormente emulsionando esta emulsión w/o en una fase acuosa que contenga (otro) antígeno, utilizando de baja a media cizalla. Convenientemente, para este propósito, puede utilizarse una emulsión basada en Montanide™ ISA 206.

También se puede mezclar una fase acuosa que contiene un antígeno cargado con gel de alumbre en un adyuvante oleaginoso para generar una emulsión w/o o w/o/w con inmunestimulación potenciada, etc.

De manera similar, la preparación de vehículos farmacéuticos para su uso en el método según la invención puede realizarse de diversas maneras, todas bien conocidas por un experto en la materia. Por ejemplo, pueden prepararse diversos geles que comprenden un antígeno: se puede preparar un gel de metilcelulosa según las instrucciones del proveedor, por ejemplo Methocel™ (Dow). Como alternativa, puede dispersarse en un disolvente no acuoso, y a continuación se puede añadir y mezclar agua y antígeno.

Además, pueden producirse microesferas de alginato según protocolos bien conocidos: primero el alginato se mezcla en agua con antígeno, y después se preparan las microesferas, por ejemplo, mediante secado por pulverización, y las microesferas se estabilizan en una solución de CaCl₂ al 1 %, pH 5 utilizando condiciones de alta cizalla.

También puede prepararse un gel a base de quitosano según las instrucciones del fabricante: se puede preparar un gel al 0,5 % p/p utilizando quitosano en agua con ácido acético, esto puede mezclarse con solución de sulfato de sodio al 10 % y someter a ultrasonido para su dispersión, seguido de neutralización. Después de la esterilización, esto se incuba con un antígeno una fase acuosa.

Los geles de alumbre, tales como hidróxido de alumbre o fosfato de alumbre, pueden adquirirse en varios proveedores como una solución de reserva al 2 % o al 3 % (por ejemplo, Brenntag, Reheis). El material a granel se puede dividir en cantidades practicables y esterilizarse en autoclave. Los geles pueden mezclarse con un antígeno, agitándolos a la vez durante 15 minutos a temperatura ambiente, en agua con un tampón, tal como Tris (10 mM) o PBS. La concentración final típica de un gel de alumbre en una vacuna final puede ser de aproximadamente 0,1 % p/v.

La primera y la segunda proteína aislada de la composición según la invención, se pueden producir u obtener de diversas maneras, pero preferentemente se producen mediante un sistema de expresión *in vitro*.

Por lo tanto, en una realización preferida del método según la invención, la primera etapa comprende las etapas de:

- expresar una secuencia de ácido nucleico que codifica la primera o la segunda proteína aislada en un sistema de expresión, y
- recoger y aislar la proteína expresada.

Los sistemas de expresión adecuados son muy conocidos y generalmente están disponibles. Son ejemplos sistemas de expresión recombinante de origen bacteriano, de levadura, de insecto, de planta, de mamífero; por ejemplo: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* sp., o *Caulobacter crescentus*; *Sacharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*; *Baculovirus*, *Drosophila*; *Tobacco*; o células Hela o CHO.

Como alternativa, la expresión también puede realizarse en los sistemas de expresión denominados acelulares, por ejemplo: el sistema de lisado de *E. coli* (Roche), o el sistema de lisado de reticulocitos de conejo (Promega corp.).

Como es bien conocido en la técnica, el sistema de expresión de proteínas hace uso de una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés. Dicha secuencia de nucleótidos puede ser un gen (es decir, una fase de lectura abierta que codifica una proteína completa), o ser un fragmento de un gen. Puede ser de origen natural o sintético.

Para dirigir la expresión a partir de la secuencia de nucleótidos, es preciso que esté bajo el control de (que esté unida operativamente a) una secuencia promotora que es funcional dentro del sistema de expresión elegido. Convenientemente, se dispone de una amplia variedad de herramientas y kits de biología molecular para cada uno de los principales sistemas de expresión, que permiten la manipulación del ácido nucleico que se va a expresar.

Es una práctica habitual adaptar la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno deseado al sistema de expresión a utilizar. Por ejemplo, la secuencia génica insertada carecerá preferentemente de una secuencia señal N terminal y de cualquier región transmembrana. Estas pueden reemplazarse por una señal de elección que se ajuste al sistema de expresión. De manera similar, puede adoptarse el uso de codones del gen insertado

para conformarse al sistema de expresión seleccionado, por ejemplo, el de *E. coli* o de células de insecto. Normalmente, esto solo se hace mediante mutaciones 'silenciosas' de tal manera que los aminoácidos codificados no se alteren.

- 5 En una realización preferida, la primera y la segunda proteína aisladas de la composición según la invención, se producen en sistemas de expresión diferentes.

Esto permite optimizar por separado sus condiciones de expresión.

- 10 En una realización preferida adicional, el antígeno Bm86 se produce mediante un sistema de expresión recombinante de baculovirus /célula de insecto, y el antígeno de Subolesina mediante un sistema de expresión recombinante de *E. coli*.

- 15 Empleando estos sistemas de expresión particulares, los antígenos de *Rhipicephalus* para su uso como antígenos aislados para la invención, se produjeron favorablemente, y mostraron eficacia mejorada cuando se aplicaron en una vacuna según la invención.

- 20 Los ácidos nucleicos que codifican la primera o la segunda proteína aislada como se describe para la invención, pueden obtenerse de varias maneras, por ejemplo, por aislamiento de una garrapata, o mediante síntesis *in vitro*, por ejemplo, basándose en la traducción inversa de una secuencia de aminoácidos determinada. Más convenientemente, las proteínas pueden sintetizarse basándose en secuencias de nucleótidos publicadas disponibles en bases de datos públicas, tales como GenBank.

- 25 Las técnicas moleculares y biológicas requeridas, que implican clonación, transfección, recombinación, selección y amplificación, son muy conocidas en la técnica y se describen ampliamente en manuales tales como: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, N.Y. (1989); Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing Co., Inc., N.Y. (1986); y: Sambrook y Russell, 2001, en: "Molecular cloning: a laboratory manual", 3ª ed. Nueva York, USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press. Como alternativa, la primera y la
30 segunda proteína aislada de la composición según la invención, se pueden proporcionar por medio de un microorganismo transportador recombinante vivo (LRC, *live recombinant carrier*). Este comprende, por ejemplo, realizaciones de un parásito, una bacteria o un virus recombinante, que se puede administrar a un ser humano o a un animal diana. Después, el microorganismo LRC sobrevive en la diana sin daño aparente y expresa y suministra al sistema inmunitario de la diana, la primera y la segunda proteína aislada de la composición según la
35 invención. Por lo tanto, las realizaciones de dichos microorganismos LRC están dentro del alcance de la invención.

- 40 La "recogida y el aislamiento" de la proteína expresada, también se realiza mediante procedimientos estándar, apropiados para el tipo de sistema de expresión que se utilizó. En particular, cuando la proteína expresada es secretada por las células del sistema de expresión, el sobrenadante del cultivo puede recogerse por centrifugación, opcionalmente seguido de concentración. Como alternativa, cuando la proteína expresada permanece dentro de las células del sistema de expresión, estas células pueden recogerse, y la proteína se produce como un extracto, como un homogeneizado con ultrasonido o como un lisado de estas células. Todo esto es muy conocido en la técnica.

- 45 En algunas realizaciones de la composición según la invención, la propia composición puede ser adecuada para su uso como una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus*. Por ejemplo, cuando el compuesto de aceite que se utilizó para la preparación de una emulsión según la invención, ya actúa como un adyuvante adecuado. Asimismo la composición según la invención puede ser, en sí misma, suficientemente inocua, estable y eficaz, para cumplir con los requisitos farmacéuticos de una vacuna comercial.

- 50 No obstante, la composición según la invención puede requerir algunos aditivos o procesamiento adicional para convertirla en una vacuna aceptable y eficaz.

- 55 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición según la invención, para su uso como una vacuna con garrapatas de *Rhipicephalus*.

- En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición según la invención, para la vacunación contra garrapatas de *Rhipicephalus*.

- 60 En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de una composición según la invención, para la fabricación de una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus*.

- En un aspecto adicional, la invención se refiere a una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus*, que comprende una composición según la invención, y un constituyente farmacéuticamente aceptable.

- 65 Una "vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus*" según la invención, es una composición inmunogénica para la administración a un ser humano o a un animal diana adecuado, que puede ser un hospedador para una garrapata

de *Rhipicephalus*. La vacuna induce en la diana una respuesta inmunitaria que afecta indirectamente a las garrapatas de *Rhipicephalus* que han infestado al hospedador, reduciendo el número, la salud y la capacidad reproductora de estas garrapatas. La vacuna según la invención también puede reducir el número o la gravedad de las lesiones y los efectos secundarios causados por la infestación de garrapatas, o la respuesta de la diana a la misma.

El término “vacuna” implica el uso de una cantidad inmunológicamente eficaz de uno o más compuestos antigénicos y un constituyente farmacéuticamente aceptable. Los compuestos antigénicos para la invención son la primera y la segunda proteína aislada de la composición según la invención.

Lo que constituye una ‘cantidad inmunológicamente eficaz’ para la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, depende del efecto deseado y de las características específicas de la vacuna que se está utilizando. La determinación de la cantidad eficaz se encuentra bien dentro de las habilidades del médico habitual, por ejemplo, monitorizando la respuesta inmunológica de la diana después de la vacunación, o después de una infestación de exposición, por ejemplo, monitorizando los signos clínicos y los parámetros serológicos de las dianas, así como mediante observación o aislamiento de garrapatas en un hospedador vacunado, y comparándolos con respuestas observadas en hospedadores no vacunados.

Una persona cualificada, tal como un criador experimentado de ganado o un veterinario, puede establecer si un hospedador humano o animal padece realmente una infestación por garrapatas de *Rhipicephalus*, y cuál es el alcance de la gravedad. Por tanto, dado que las garrapatas de *Rhipicephalus* adultas y repletas de sangre, tienen un tamaño entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3 cm, pueden observarse fácilmente en un hospedador. Determinar cualquier infestación en fase de ninfa de las garrapatas de *Rhipicephalus*, puede requerir la observación al microscopio de una muestra obtenida de un hospedador. Un experto en la técnica puede determinar si una garrapata observada pertenece al género *Rhipicephalus*.

Por tanto, se dispone fácilmente de métodos para evaluar la eficacia de una vacuna según la invención, e conlleva observar la diferencia que una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, hace en cuanto a la extensión y a las consecuencias de una infestación de garrapatas de *Rhipicephalus*, entre hospedadores vacunados y no vacunados.

Otro efecto ventajoso de la vacuna según la invención, es la prevención o la reducción de la propagación de las garrapatas de *Rhipicephalus* en un área geográfica o en una población; esto es, propagación horizontal o infestación ambiental. Como consecuencia, el uso de una vacuna según la invención, conduce a una reducción de la prevalencia de garrapatas de *Rhipicephalus*.

Por lo tanto, en una realización preferida, la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, es capaz de reducir la prevalencia de garrapatas de *Rhipicephalus* en un área geográfica.

Un “constituyente farmacéuticamente aceptable” ayuda en la administración eficaz de una vacuna, sin causar efectos adversos (graves) a la salud de la diana a la cual se administra. Dicha solución puede ser, por ejemplo, agua estéril o una solución salina fisiológica estéril. En una forma más compleja, la solución puede ser, por ejemplo, un tampón, que puede comprender aditivos adicionales, tales como un estabilizante, conservante o adyuvante. En manuales muy conocidos se describen detalles y ejemplos.

La vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, puede comprender un estabilizante, por ejemplo, para proteger a los componentes propensos a la degradación, o para mejorar el periodo de validez de la vacuna. Generalmente, los estabilizadores son moléculas grandes de alto peso molecular, tales como lípidos, hidratos de carbono o proteínas; por ejemplo, leche en polvo, gelatina, albúmina sérica, sorbitol, trehalosa, espermidina, dextrano o polivinilpirrolidona, y tampones, tales como fosfatos de metales alcalinos. Preferentemente el estabilizante carece de compuestos de origen animal.

La vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, puede comprender un conservante, tal como timerosal, mertiolato, compuestos fenólicos y/o gentamicina.

Huelga decir que la mezcla de otros aditivos, que son necesarios o beneficiosos para la estabilidad o eficacia farmacéutica de la vacuna según la invención, está también dentro del alcance de la invención.

Cuando la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, no está en forma de emulsión, esta puede ser una solución acuosa, por ejemplo, en la realización en la que la primera y la segunda proteína aislada de la composición según la invención, están comprendidas en vehículos farmacéuticos separados. En este caso, la vacuna puede liofilizarse para aumentar su estabilidad, y permitir un almacenamiento prolongado a temperaturas por encima de la congelación.

Los expertos en la técnica conocen procedimientos para llevar a cabo la liofilización y en el comercio se dispone de equipos de liofilización a diferente escala.

Por lo tanto, en una realización más preferida, la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, se caracteriza por que la vacuna está en forma liofilizada.

5 Para reconstituir una composición de vacuna liofilizada, esta se suspende en un diluyente fisiológicamente aceptable. Habitualmente, esto se hace inmediatamente antes de la administración, para determinar la mejor calidad de la vacuna. El diluyente puede ser, por ejemplo, agua estéril, o una solución salina fisiológica. El propio diluyente a utilizar para reconstituir la vacuna puede contener compuestos adicionales, tales como un adyuvante. En otra realización, la vacuna liofilizada puede suspenderse en una emulsión como se indica en el documento EP 382.271.

10 En una realización adicional de la vacuna liofilizada según la invención, el diluyente para la vacuna se suministra por separado de la torta liofilizada, que comprende la composición de vacuna activa. En este caso, la vacuna liofilizada y la composición diluyente forman un kit de componentes que conjuntamente representan la presente invención.

15 Por lo tanto, en una realización preferida de la vacuna liofilizada contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, la vacuna está comprendida en un kit de componentes con al menos dos tipos de envases, un envase que comprende la vacuna liofilizada y otro que comprende un diluyente acuoso.

20 Las dianas de la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, son evidentemente hospedadores humanos o animales, susceptibles a infestación con garrapatas de *Rhipicephalus*, como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la edad, el peso, el sexo, el estado inmunológico y otros parámetros de la diana a vacunar no son críticos, aunque es evidentemente favorable vacunar dianas saludables, y vacunar lo antes posible para prevenir una infestación. Por tanto, dado que una infestación por garrapatas de *Rhipicephalus* puede establecerse ya a una edad joven, la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, puede aplicarse a las 2 primeras semanas después del nacimiento.

25 Las dianas preferidas para la vacuna según la invención, son cualquier hospedador animal de compañía o ganado, que sea susceptible a infestación por garrapatas de *Rhipicephalus*. Más preferentemente el animal diana es un animal canino, bovino, equino, porcino, caprino, ovino o cervino. Incluso más preferentemente, el animal diana es un animal bovino, y lo más preferentemente el animal diana es: ganado taurino (*Bos taurus*), ganado cebú (*Bos indicus*), búfalo, bisonte, yak o bisón.

30 La vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, puede utilizarse igualmente como tratamiento profiláctico o terapéutico, e interfiere tanto con el establecimiento como con la progresión de una infestación por garrapatas de *Rhipicephalus* y sus consecuencias.

35 La vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, puede servir de un modo eficaz como una primovacuna, que puede ser seguida y amplificada por una o más vacunaciones de refuerzo, ya sea con la misma vacuna o contra otra vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus*.

40 El programa de administración de la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, se integra preferentemente en programas de vacunación existentes para otras vacunas para esa diana.

45 Preferentemente, la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, se aplica como una dosis anual. Sin embargo, en áreas donde la infestación de garrapatas de *Rhipicephalus* es alta, puede requerirse una nueva vacunación a intervalos más cortos, por ejemplo, después de 6 meses.

50 La vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, puede administrarse en dosis que contienen entre 1 y 1000 µg de cada una de la primera y segunda proteína aislada de la composición según la invención. En un principio se pueden utilizar dosis más pequeñas o más grandes; preferentemente una dosis de vacuna contiene entre 10 y 1000 µg de cada una de las dos proteínas.

55 En una serie de experimentos de seroconversión *in vivo*, se ensayaron diferentes relaciones de antígenos Bm86 y Subolesina. Se encontró que no era necesario que las cantidades de los dos antígenos fuesen iguales; de hecho se encontró que era favorable tener en una dosis animal más del antígeno de Subolesina por dosis que de la proteína Bm86.

60 En comparación con una formulación particular que comprende las mismas cantidades de antígenos de Bm86 y Subolesina por dosis, el título de anticuerpo obtenido en terneros contra Subolesina podía mejorarse cuando se utilizaba una formulación similar que comprendiese una cantidad de antígeno de Subolesina mayor que la de Bm86; esto no afectó al título frente a Bm86.

65 Por lo tanto, en una realización, la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, comprende la primera y la segunda proteína aislada, en la que la cantidad de cada una de las proteínas en microgramos por dosis difiere en más de 5 %.

En una realización preferida de la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, la cantidad de una de las dos proteínas en microgramos por dosis, es aproximadamente el doble que la de la otra proteína.

En una realización preferida, la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, comprende aproximadamente 25 µg/dosis de Bm86 y aproximadamente 50 µg/dosis de Subolesina.

5 Una vacuna según la invención, que comprende dicha diferencia en la relación de proteínas, demostró una eficacia mejorada sobre una vacuna que comprende las mismas cantidades en microgramos por dosis de ambas proteínas.

10 La vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, se administra en un volumen que es aceptable para la diana. Por ejemplo, el volumen de una dosis de vacuna puede estar entre 0,1 y 10 ml. Preferentemente, el volumen de una dosis está entre 0,25 y 5 ml.

15 La vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, puede administrarse a una diana según métodos conocidos en la técnica. La aplicación preferida es por vía parenteral, tal como a través de cualquier vía de inyección dentro o a través de la piel, por ejemplo: intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, submucosa o subcutánea.

20 La vía de aplicación preferida para la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, es por inyección intramuscular o subcutánea.

Huelga decir que la vía óptima de aplicación dependerá de la formulación de la vacuna específica que se utilice, y de las características particulares de la diana.

25 Está bien al alcance de un experto en la materia optimizar aún más la vacuna contra las garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención. Generalmente, esto implica el ajuste refinado de la eficacia de la vacuna, de modo que proporcione suficiente inmunoprotección. Esto puede hacerse adaptando la dosis de la vacuna, el volumen o el contenido de antígeno; utilizando la vacuna en otra forma o formulación; adaptando los otros constituyentes de la vacuna (por ejemplo, el estabilizante o el adyuvante); o por aplicación a través de una vía o método diferente.

30 La vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, puede comprender adicionalmente otros compuestos, tales como un adyuvante, un antígeno adicional, una citocina, etc. Como alternativa, la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, puede combinarse ventajosamente con un componente farmacéutico, tal como un antibiótico, una hormona o un fármaco antiinflamatorio.

35 En una realización preferida, la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, se caracteriza por que comprende un adyuvante.

40 Un "adyuvante" es un ingrediente de vacuna bien conocido, que estimula la respuesta inmunitaria de una diana de una manera inespecífica. En la técnica se conocen muchos adyuvantes diferentes. Como ejemplos de adyuvantes se incluyen: adyuvante completo e incompleto de Freund, vitamina E, polímeros de bloque no iónicos y poliaminas tales como sulfato de dextrano, carbopol y pirano, compuestos de aluminio tales como fosfato de alumbre o hidróxido de alumbre, Saponina, etc..

45 Además, como adyuvante, a menudo se utilizan péptidos tales como muramildipéptidos, dimetilglicina, tuftsin, y ventajosamente puede utilizarse aceite mineral, por ejemplo Bayol™ o Markol™, Montanide™ o aceite de parafina ligero, aceites vegetales o productos combinados, tales como ISA™ de Seppic o DiluvacForte™.

Un manual sobre adyuvantes y sus usos y efectos es: "Vaccine adjuvants" (Methods in molecular medicine, vol. 42, D. O'Hagan ed., 2000, Humana press, NJ, ISBN-10: 0896037355).

50 Además del posible efecto adyuvante que ya pueden proporcionar los componentes de la composición según la invención, la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención comprende preferentemente un adyuvante de saponina.

55 Por lo tanto, en una realización preferida, la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención comprende una saponina.

En una realización preferida adicional de una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, la vacuna es una emulsión, en la que la saponina está comprendida en al menos una de las fases acuosas.

60 En una realización preferida adicional, una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, es una emulsión de agua en aceite, en la que Montanide ISA 50V2 está comprendido en la fase oleaginosa, y la saponina Quil A está comprendida en al menos una de las fases acuosas.

Se encontró que el uso combinado tanto de un adyuvante de Montanide como de saponina, inducía una respuesta inmunitaria más eficaz en comparación con cuando solo se utilizaba uno de estos dos adyuvantes.

65 Una "saponina" es un compuesto glucosídico activo en superficie muy conocido. Los productos comerciales son Quil A™ (Brenntag), Q-vac™ (Biolang), VaxSap™ (Desert King) y Abisco100™ (Isconova). Como una saponina es

hidrófila, puede estar comprendida fácilmente en una o más de las fases acuosas de la vacuna según la invención. Un adyuvante de saponina está comprendido preferentemente en la vacuna según la invención, a un nivel entre 10 y 10.000 µg/ml, más preferentemente entre 50 y 5000 µg/ml, incluso más preferentemente entre 100 y 1000 µg/ml.

5 Se encontró que la inclusión de una saponina como adyuvante (adicional) proporcionaba un fuerte refuerzo a los niveles de anticuerpos que podrían inducirse con una vacuna según la invención. En parte, esto se explicó por el aumento de los anticuerpos de tipo IgG2a que se desarrollaron además de los anticuerpos de tipo IgG1 que se generaron sin saponina. En el contexto de una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus*, la generación de anticuerpos de tipo IgG2a es tanto más favorable cuanto que se considera que estos anticuerpos son menos dependientes de los factores del complemento para sus efectos dañinos de las células, después de los anticuerpos de tipo IgG1.

10 La vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, puede combinarse ventajosamente con otro antígeno, por ejemplo, procedente de otro patógeno, o un compuesto inmunológicamente activo.

15 Por lo tanto, en una realización preferida, la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, comprende un componente inmunoactivo adicional.

20 El "componente inmunoactivo adicional" puede ser un antígeno, y/o una sustancia que mejora el sistema inmunitario; cualquiera de estos puede comprender un adyuvante.

25 Cuando el componente inmunoactivo adicional está en forma de un antígeno, puede consistir en cualquier componente antigénico de importancia veterinaria. Puede comprender, por ejemplo, una molécula biológica o sintética tal como una proteína, un hidrato de carbono, un lipopolisacárido, o una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno proteico. También una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico, o un microorganismo LRC que contiene dicha molécula de ácido nucleico, puede ser una forma de liberar una molécula de ácido nucleico o el componente inmunoactivo adicional. Como alternativa, puede comprender un microorganismo fraccionado o destruido tal como un parásito, una bacteria o un virus.

30 El componente (o componentes) inmunoactivo adicional puede estar en forma de una sustancia que mejora el sistema inmunitario, por ejemplo, una quimiocina, o un ácido nucleico inmunoestimulador que comprende un motivo CpG no metilado. Como alternativa, la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, puede añadirse por sí misma a una vacuna.

35 En una realización preferida, el componente inmunoactivo adicional es, o se obtiene de, un microorganismo infeccioso para un ser humano o un animal que también es una diana para la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención.

40 La ventaja de dicha vacuna de combinación es que no solo induce una respuesta inmunitaria contra las garrapatas de *Rhipicephalus*, sino también contra otros patógenos, mientras que solo se requiere una sola manipulación de la diana para la vacunación, reduciendo así el estrés de vacunación a la diana, así como el tiempo y costes de mano de obra.

45 Son ejemplos de dichos componentes inmunoactivos adicionales, en principio todos los patógenos de virus, bacterias y parásitos, o un antígeno procedente de los mismos, que son aplicables para la vacunación de un ser humano o animal que es también una diana para la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención.

50 Por ejemplo, para porcinos: el circovirus porcino, el virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino, el virus de la pseudorrabia, el parvovirus porcino, el virus de la peste porcina clásica, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Lawsonia intracellularis*, *E. coli*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Clostridia*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Erysipelothrix*, *Bordetella*, *Toxoplasma*, *Isospora*, *Trichinella*, etc.

55 Para bovinos: *Neospora*, *Dictyocaulus*, *Cryptosporidium*, *Ostertagia*, *Babesia*, *Theileria*, *Anaplasma*, *Trypanosoma*, *Cowdria*, *Toxoplasma*, rotavirus bovino, virus de la diarrea vírica bovina, coronavirus bovino, virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (herpesvirus bovino), paramixovirus bovino, virus paragripal bovino, virus sincitial respiratorio bovino, virus de la rabia, virus de lengua azul, *Pasteurella haemolytica*, *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Brucella*, *Clostridia*, *Mannheimia*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, etc.

60 Para ovinos o caprinos: *Toxoplasma*, *Neospora*, *Cowdria*, *Babesia*, *Theileria*, *Anaplasma*, *Eimeria*, *Trypanosoma*, peste de virus de pequeños rumiantes, virus de lengua azul, virus *Schmallenberg*, *Mycobacterium*, *Brucella*, *Clostridia*, *Coxiella*, *E. coli*, *Chlamydia*, *Clostridia*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, etc.

65 Para caninos: *Ehrlichia*, complejo *Leishmania donovani*, *Neospora*, *Anaplasma*, *Dirofilaria*, *Dypilidium*, parvovirus canino, virus del moquillo canino, adenovirus canino, tipos 1 o 2, virus de la hepatitis canina, coronavirus canino, virus paragripal canino, virus de la rabia, calicivirus felino, herpesvirus felino, virus de la panleucopenia felina, *Clostridium*, *Hepatozoon*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella bronchiseptica*, *Chlamydia*, *Babesia*, *Theileria*, etc.

Una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención se prepara por medios muy conocidos por un experto en la materia.

5 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la preparación de una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus*, que comprende mezclar una composición según la invención y un constituyente farmacéuticamente aceptable.

10 La vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, puede prepararse mediante métodos tales como los descritos en la presente memoria, que puede aplicar fácilmente un experto en la materia. Por ejemplo, la primera y la segunda proteína aislada, como se describe para la invención, se pueden producir industrialmente en volúmenes más pequeños o más grandes, en un sistema de expresión. La proteína se recoge de las células del cultivo de expresión o sobrenadante. Si es necesario, por razones de bioseguridad, el producto de proteína recogido puede inactivarse biológicamente en primer lugar.

15 Esto puede realizarse de diversas maneras, comúnmente por inactivación química, tal como con formalina, beta-propiolactona, etilenimina binaria o beta-etanolamina.

20 A través de medios físicos (prensa francesa, ultrasonido) o químicos (detergentes, agentes caotrópicos) puede producirse un lisado. La suspensión se puede purificar adicionalmente, o se puede concentrar, por ejemplo, por centrifugación o filtración. La preparación de antígeno resultante se combina después con constituyentes farmacéuticamente aceptables, se formula en una vacuna y se rellena en envases de tamaño apropiado. Las diferentes etapas del proceso de fabricación serán controladas mediante ensayos adecuados, por ejemplo, mediante ensayos inmunológicos en lo que respecta a la calidad y cantidad de los antígenos; mediante ensayos microbiológicos para la inactivación, esterilidad y ausencia de agentes extraños; y finalmente mediante estudios en animales para confirmar la eficacia y seguridad de la vacuna. Todos estos ensayos son muy conocidos por un experto en la materia. Después de finalizar los ensayos de calidad, cantidad y esterilidad, dichos productos de vacuna se comercializan.

30 Las técnicas y cuestiones generales que se aplican a la preparación de vacunas son muy conocidas en la materia y se describen, por ejemplo, en regulaciones gubernamentales (Farmacopea) y en manuales archiconocidos.

35 Preferentemente, la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, se formula en una forma que es adecuada para inyección parenteral, es decir, un líquido inyectable, tal como una suspensión, solución, dispersión o emulsión. Comúnmente dichas vacunas se preparan estériles y a un pH fisiológico.

40 En una realización preferida adicional, la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, comprende como primera proteína aislada, 25 µg/dosis de Bm86 expresada en baculovirus/células de insecto, y como segunda proteína aislada, 50 µg/dosis de Subolesina expresada en *E. coli*, en la que cada proteína aislada está comprendida en una fase acuosa separada de una emulsión de agua en aceite, por lo que cada fase acuosa comprende también saponina Quil A, y la fase oleaginoso comprende Montanide ISA 50V2.

45 Tal como se ha descrito, la vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención, puede aplicarse ventajosamente a una diana humana o animal que sea un hospedador susceptible a infestación por garrapatas de *Rhipicephalus*. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de vacunación de una diana contra garrapatas de *Rhipicephalus*, que comprende la administración a la diana de una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus* según la invención.

50 Este descubrimiento puede ahora utilizarse ventajosamente en una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus*, esencialmente de dos maneras: particularmente mediante una sola administración o una administración doble.

55 Cuando las dos proteínas se aplican en una sola administración, necesitan formularse de tal manera que permanezcan separadas entre sí en la composición de vacuna final, como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, las dos proteínas pueden aplicarse en una administración doble, para su presentación por separado a un sistema inmunitario de una diana, con el fin de inducir una reacción inmunoprotectora contra la infestación de garrapatas de *Rhipicephalus*. Esto puede lograrse ventajosamente por administración a una diana en diferentes lugares del cuerpo, por vías o diferentes o por métodos diferentes.

60 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a la primera proteína aislada como se describe para la invención, para la vacunación de una diana contra garrapatas de *Rhipicephalus*, caracterizada por que la proteína se administra simultáneamente con la segunda proteína aislada como se describe para la invención, pero en diferentes lugares del cuerpo, por vías o diferentes o por métodos diferentes.

65 También, en un aspecto adicional, la invención se refiere a la segunda proteína aislada como se describe para la invención, para la vacunación de una diana contra garrapatas de *Rhipicephalus*, caracterizada por que la proteína se administra simultáneamente con la primera proteína aislada como se describe para la invención, pero en diferentes

lugares del cuerpo, por vías o diferentes o por métodos diferentes.

5 En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de la primera y la segunda proteína aislada como se describe para la invención, para la vacunación de una diana contra garrapatas de *Rhipicephalus*, caracterizado por que las proteínas se administran simultáneamente pero en diferentes lugares del cuerpo, por vías o diferentes o por métodos diferentes.

10 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de vacunación de una diana contra garrapatas de *Rhipicephalus*, que comprende la administración a la diana de la primera y la segunda proteína aislada como se describe para la invención, caracterizado por que la administración de las proteínas es simultánea pero en diferentes lugares del cuerpo, por vías o diferentes o por métodos diferentes.

15 El término "simultáneo" indica que hay un determinado periodo de tiempo en el que tanto la primera proteína aislada como la segunda proteína aislada, como se describe para la invención, deben haberse administrado a una diana. El propósito de esta administración simultánea (pero separada) al sistema inmunitario de la diana, es inducir respuestas inmunitarias humorales fuertes contra cada una de las proteínas. Por lo tanto, dado que una respuesta inmunitaria humoral en un mamífero puede tardar hasta 14 días en desarrollarse, ambas proteínas han de administrarse a una diana en un periodo de aproximadamente 14 días. Por consiguiente, para la invención 'simultáneo' significa: en un período de aproximadamente 14 días.

20 Preferentemente, el periodo para la administración simultánea es más corto, por lo tanto en una realización preferida, 'simultáneo' significa en un periodo de 12, 10, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 días, en ese orden de preferencia. Lo más preferido es que simultáneo signifique: en un periodo de 1 día.

25 Para la invención, la administración a una diana de la primera y segunda proteína aislada como se describe para la invención, debe ser "en diferentes lugares del cuerpo, por diferentes vías o por diferentes métodos". Esto sirve para garantizar la presentación por separado de las dos proteínas al sistema inmunitario de la diana.

30 Para la invención, 'diferentes lugares del cuerpo' significa que los lugares de aplicación, para la administración de (las vacunas que contienen) la primera y la segunda proteína aislada como se describe para la invención, en el cuerpo de la diana, están físicamente separados. En una realización, esto se refiere al uso de distintas jeringas, conteniendo cada una de ellas, cualquier proteína, y estas se usan después para proporcionar inyecciones separadas en diferentes lugares del cuerpo de la diana, normalmente a más de 1 cm de distancia, preferentemente al menos a 5, 8, 10, 15, 20, o al menos a 30 cm de distancia, en ese orden de preferencia.

35 En una realización alternativa, esto puede referirse al uso de un dispositivo de inyección multipunto; teniendo el dispositivo más de un punto de inyección, cada uno de ellos conectado a una cámara o envase separado que comprende (una vacuna que comprende) ya sea la primera o la segunda proteína aislada como se describe para la invención. Dichos dispositivos de inyección multipunto son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización esto puede referirse a una jeringa de combinación o doble con cámaras separadas, correspondiéndose cada cámara con una aguja separada; estando las agujas algo separadas entre sí, por ejemplo, entre aproximadamente 0,1-2 cm

40 Aunque el uso de un dispositivo de inyección multipunto únicamente requiere una sola acción de administración, dicha administración de la vacuna según la invención, es no obstante una administración doble para la invención. Esto se debe a que la primera y la segunda proteína aislada como se describe para la invención, se administran en diferentes lugares del cuerpo de la diana. Esta realización se diferencia del uso de un dispositivo de inyección de punto único, como se ha descrito anteriormente.

50 Para la invención, "por vías diferentes" se entiende el uso de dos vías de administración diferentes seleccionadas de vías conocidas en la técnica, y apropiadas para la diana específica, por ejemplo:

- 55 - por inyección: intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, submucosa o subcutánea.
- por aplicación tópica, como una gota, pulverización, gel o pomada, al epitelio mucoso del ojo, nariz, boca, ano o vagina, o sobre la epidermis de la piel externa.
- por pulverización como aerosol, o polvo.
- a través de la vía alimentaria, por combinación con el alimento, pienso o agua potable, por ejemplo, en forma de polvo, líquido o comprimido o
- 60 - por administración directamente en la boca, como un líquido, un gel, un comprimido, o una cápsula, o en el ano como un supositorio.

En una realización preferida, las vías diferentes comprenden la aplicación subcutánea e intramuscular.

65 También "por métodos diferentes" se refiere a las diversas maneras en las que se puede formular la primera y segunda proteína aislada descritas para la invención. Muchos de estos métodos ya se han enumerado en las

opciones para vías diferentes, por ejemplo: un líquido, un gel, una pomada, un polvo, un comprimido, o una cápsula. A este respecto, el líquido puede ser una suspensión, solución, dispersión, o una emulsión.

5 En una realización preferida, los métodos diferentes se seleccionan de una emulsión, una suspensión y una dispersión.

10 Como será obvio para un experto, las diferentes formas de aplicación (localización, vía y método) pueden combinarse ventajosamente. Por lo tanto, en una realización preferida, la primera y la segunda proteína aislada como se describe para la invención, se administran a una diana mediante una combinación de diferencias en su modo de aplicación.

15 Para las realizaciones de la invención relacionadas con la administración doble, la primera y la segunda proteína aislada como se describe para la invención, pueden ofrecerse convenientemente para su comercialización en una forma en la que ambas proteínas se proporcionan en envases distintos en sus preparaciones farmacéuticas específicas. Para facilitar el uso, los dos envases pueden proporcionarse en un paquete, opcionalmente con un diluyente, y/o un conjunto de instrucciones para su administración.

20 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit de componentes que comprende al menos dos envases, comprendiendo un envase la primera proteína aislada como se describe para la invención, y el otro envase la segunda proteína aislada como se describe para la invención.

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

25 Ejemplos

1. Métodos y materiales generales

1.1. PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS Bm86 y SUBOLESINA

30 Para los diversos estudios realizados *in vivo* e *in vitro* con los antígenos Bm86 y Subolesina, se han utilizado diversos sistemas de expresión recombinante diferentes. En todos los casos, la expresión de la proteína era detectable sin requerir modificaciones especiales. Además, todos los antígenos producidos, ya sea procedentes de procariontes o de eucariotes, y ya sea de sistemas eucariotes superiores o inferiores; los antígenos siempre fueron reconocidos por antiseros bovinos específicos, y fueron inmunológicamente activos, por ejemplo, en ensayos de alimentación artificial de garrapatas. Esto indica que los antígenos de proteínas utilizados, Bm86 y Subolesina, no requieren modificaciones postraduccionales complejas para ser inmunoprotectores. Algunas combinaciones de antígeno y sistema de expresión se describirán con más detalle.

40 1.1.1. Expresión de Subolesina mediante un sistema de expresión en *E. coli*:

45 Para la expresión en bacterias de *Escherichia coli*, se utilizó un plásmido de transferencia/clonación, que estaba basado en el plásmido comercial pET14 b. El gen de Subolesina, que se expresó en *E. coli*, se obtuvo de una garrapata *R. (Boophilus) microplus* de Méjico, y su secuencia completa se presenta en GenBank n.º de registro: ABA62327. La proteína expresada era la versión de 147 aminoácidos truncada en el extremo C, esencialmente como se representa en la SEQ ID NO: 2.

50 Se construyeron cebadores de ADN para la subclonación conveniente del gen de Subolesina en el plásmido pET, y para proporcionarle un péptido de fusión N terminal con 6 histidinas, para facilitar la purificación y la detección. Para la expresión se utilizaron células de *E. coli* BL21 (DE3)TM (Invitrogen) comerciales convencionales, utilizando medio comercial convencional basado en LB con ampicilina. El cultivo duró toda la noche a 37 °C y a 200 rpm.

55 Como los plásmidos de tipo pET están configurados para la sobreexpresión, el antígeno de Subolesina se encontró intracelular en cuerpos de inclusión. Estos se recogieron por centrifugación de las células, seguido de ultrasonido. A continuación, los cuerpos de inclusión de Subolesina se desnaturalizaron utilizando un tampón de Urea 6 M. Después, la proteína se purificó utilizando una columna His-Trap, por ejemplo, un cartucho IMAC de ProfiniaTM (BioRad Bio Scale). El antígeno de Subolesina eluido se concentró por centrifugación sobre un filtro PES con un límite de peso molecular, MWCO, de 3,5 (Vivaspin) y se dializó para la renaturalización frente a tampón MES (ácido morfolino etanosulfónico) 50 mM, a pH 5,8, sobre una membrana de diálisis con un MWCO de 3,5 kDa (SpectraPore).

60 Este antígeno de Subolesina purificado se caracterizó adicionalmente utilizando varias técnicas. Después de SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, la Subolesina purificada mostró una banda principal de 20 kDa y algunas bandas pequeñas, probablemente multímeros, a 40, 60 y 80 kDa. En una transferencia Western, utilizando antiseros anti-Subolesina policlonal de bovino, se reconocieron específicamente las bandas de 20, 40 y 60 kDa.

65

En un ensayo Elisa basado en antígenos, la unión específica a esta Subolesina pudo diluirse por titulación del antígeno. Después de la purificación con la columna His-trap, el antígeno de Subolesina tenía una pureza tan alta que su cantidad pudo determinarse en un ensayo de proteínas basado en BCA (ácido bicinonínico) estándar (Pierce), que indicó que podía obtenerse, de manera habitual, una concentración de aproximadamente 100 mg/l de Subolesina. La proteína aislada se conservó congelada a -70°C hasta su uso.

1.1.2. Expresión de Subolesina o de Bm86 mediante un sistema de expresión en *Pichia*

La expresión del antígeno de Subolesina o de Bm86 en *Pichia* se realizó esencialmente como se describe en (Almazán *et al.* 2010, y Canales *et al.*, 2008, ambos citados anteriormente). En resumen: los genes codificantes se expresaron utilizando, como vector de transferencia, el plásmido comercial pPICZ α (Invitrogen). Este se construyó y amplificó en *E. coli*, y después se utilizó para la transformación de células X-33 competentes de *P. pastoris*. Este vector de transferencia proporciona integración estable en el cromosoma de *Pichia*, bajo el control del promotor AOX1. Dependiendo del número de insertos génicos, un clon específico de célula puede tener una capacidad de expresión más alta o más baja. La expresión se realizó utilizando condiciones convencionales; primero las células se amplificaron en medio básico con extractos de levadura y de proteína de soja y glicerol. Después de la amplificación el cultivo se indujo para expresarse a partir del promotor AOX cambiando al medio a un medio con metanol al 2 %, y la incubación continuó durante otras 48 horas.

Ambos antígenos se expresaron utilizando una secuencia señal específica de *Pichia* (MAT alfa prepro), y Bm86 no tenía secuencia transmembrana. En consecuencia, las proteínas se produjeron en el sobrenadante del cultivo, del cual se concentraron y se utilizaron para la caracterización y la formulación de la vacuna.

1.1.3. Expresión de Bm86 mediante un sistema de expresión de baculovirus

Para la expresión de la proteína Bm86 en un sistema de expresión de baculovirus – células de insecto, se obtuvo el gen Bm86 de una garrapata *R. (Boophilus) microplus* de Méjico, su secuencia es la misma que la del GenBank n.º de registro ADQ19685. La secuencia de nucleótidos codificante se optimizó para adaptarse al uso de codones de un baculovirus sin cambiar la proteína codificada, ya que todas las mutaciones realizadas eran silenciosas. El gen que fue expresado por baculovirus contenía la secuencia señal Bm86, pero no la región transmembrana; de esta manera la proteína se secretó fuera de las células de insecto, y no permanecía unida a la membrana celular. La proteína Bm86 expresada en baculovirus madura resultante tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

El plásmido vector de transferencia utilizado para la clonación y expresión fue el plásmido comercial pVL1393 que proporciona expresión del promotor del gen de la polihedrina. Después de la transfección, los baculovirus recombinantes se seleccionaron mediante una serie de rondas de purificación en placa. Se seleccionó un recombinante por ser estable y productivo, este se utilizó para aumentar la escala y producir proteínas. Normalmente se cultivaron células de insecto Sf9 o Sf21 en medio comercial SF900, se infectaron a una m.o.i. de aproximadamente 0,1 y la proteína se recogió después de 4-5 días de incubación a 28 °C. La proteína Bm86 obtenida del sobrenadante del cultivo de células de insecto se recogió por centrifugación, inactivación de baculovirus recombinante y concentración sobre membranas Vivaspin™.

El antígeno Bm86 purificado se caracterizó adicionalmente utilizando antisueros anti-Bm86 específicos de conejo o bovino, mediante varias técnicas: un ensayo Elisa de tipo sándwich, y un SDS-PAGE/transferencia Western para una banda de aproximadamente 80 kDa. La medición de la cantidad de proteína de Bm86 estaba en cierta medida alterada por el alto contenido de cisteína de esta proteína, por lo tanto un ensayo estándar BCA o Lowry dio cantidades incorrectas. Sin embargo, ambos ensayos estándar de Bradford o CBB mostraron mediciones fiables, indicando que en el sistema de expresión de baculovirus, podían producirse de manera habitual aproximadamente 400 µg/ml de antígeno de proteína Bm86.

1.1.4 Caracterización de proteínas

Para estar seguros de la identidad de las proteínas Bm86 y Subolesina producidas por un sistema de expresión, se sometieron a análisis de secuencias proteicas de sus fragmentos tripticos utilizando cromatografía y espectrometría de masas (Radboud University Proteomics Centre, Nijmegen, NL). En resumen: se cortaron tiras de gel que contenían proteínas de la SDS-PAGE preparativa. Las proteínas se digirieron en gel con tripsina, se eluyeron, y se analizaron en una columna de cromatografía líquida que se acopló a un espectrómetro de masas de resonancia de ciclotrón. Las secuencias de proteínas encontradas se analizaron por antecedentes conocidos y contaminaciones y se ensamblaron las secuencias de las proteínas Bm86 y Subolesina. Se encontró que tanto Bm86 como Subolesina eran la única proteína dominante en sus respectivas muestras. La cobertura de la secuencia de proteína de Subolesina fue del 88 %, para Bm86 de 68 %. No obstante, se encontró que los resultados coincidían exactamente con las secuencias de aminoácidos que pretendían expresarse.

1.2. ENSAYOS SEROLÓGICOS

Para los diversos ensayos serológicos utilizados durante los experimentos, se utilizaron ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA). Estos se realizaron como un ensayo Elisa de tipo sándwich (captura) convencional, y se configuraron para análisis de muestras que contenían anticuerpo o antígeno. Su disposición básica fue siempre la misma, en resumen: un anticuerpo de captura se aplicó a los pocillos de una placa de titulación por incubación durante una noche. La placa se lavó después y se incubó con un antígeno que reconocía específicamente el anticuerpo de captura. Después de incubación y lavado, se añadió un segundo anticuerpo diferente que también podía reconocer el antígeno. Después de incubación y lavado, se añadió un tercer anticuerpo, que era específico para el tipo de IgG del segundo anticuerpo. El tercer anticuerpo se conjugó con una enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) que permite que una reacción de color revele si se ha unido algún antígeno, leyendo en un lector Elisa fotospectrométrico adecuado.

Para la detección de la proteína o anticuerpo Bm86, el ensayo Elisa empleó una IgG de conejo anti-Bm86 (*Pichia*) para la captura, un segundo anticuerpo de vaca anti-Bm86 (báculo) y un anti-IgG bovino de cabra conjugado con HRP.

Para la detección de la proteína o anticuerpo Subolesina, el ensayo Elisa empleó un anticuerpo anti-etiqueta His comercial para la captura, un anticuerpo secundario anti-Subolesina de vaca y un anti-IgG bovino de cabra conjugado con HRP.

Todos los procedimientos utilizados eran convencionales o recomendados por el proveedor; de manera similar todos los materiales utilizados eran convencionales, tales como placas, tampones utilizados para recubrimiento, incubación, lavado o bloqueo, sustrato colorante, etc. Siempre que fuera posible el lavado de placas Elisa, la lectura y el cálculo de resultados se realizaron mediante un método y equipo automatizados.

Cuando el Elisa estaba destinado para la detección y cuantificación de anticuerpos en una muestra (Elisa de fuerza), tal como en sueros animales de un estudio de vacunación, entonces el antígeno utilizado fue un antígeno de referencia y el suero de ensayo se tituló como segundo anticuerpo, junto a un segundo anticuerpo de referencia. A la inversa, cuando el Elisa estaba destinado para la detección y cuantificación del material antigénico en una muestra (Elisa de masa antigénico), tal como se produjo a partir de un sistema de expresión, el antígeno de ensayo se tituló en las placas, junto a una muestra de antígeno de referencia, y el segundo anticuerpo era un anticuerpo de referencia.

Cuando era relevante determinar si un anticuerpo era de tipo IgG1 o de tipo IgG2, se utilizó un anticuerpo conjugado selectivo, por ejemplo, un anticuerpo de oveja anti-IgG1 de vaca, o un anticuerpo de oveja anti-IgG2a de vaca comercial.

Los resultados de estos ensayos Elisa son valores de títulos que son arbitrarios, lo que significa que sus valores numéricos dependen de las muestras de referencia específicas y del modo de dilución que se utilizó. Por lo tanto, su valor exacto no es relevante, ya que otras formas de realizar dicho ensayo Elisa utilizando una muestra de referencia diferente darán como resultado un valor diferente. Sin embargo, debido a que todas las muestras dentro de estos experimentos se ensayaron de la misma manera, su valor relativo es relevante y permite establecer comparaciones de títulos de antígeno o anticuerpo entre muestras que fueron analizadas con el mismo ensayo.

1.3. FORMULACIÓN DE VACUNAS

Las emulsiones y los geles se prepararon en principio según las instrucciones del fabricante, con pequeñas adaptaciones para ajustarse a requisitos específicos de equipo o volumen. En resumen:

- Se prepararon emulsiones de Montanide™ ISA50V2 completamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Seppic). El Montanide se mezcló 50:50 con una fase acuosa de proteína en PBS, mediante mezcla a alta cizalla a temperatura ambiente, durante aproximadamente 10 minutos. La temperatura se monitorizó para no superar aproximadamente 35 °C. El Montanide se había esterilizado-filtrado antes de su uso. Las emulsiones se inspeccionaron visual y microscópicamente (amplificación 1000x) con respecto al color y la uniformidad.
- Se prepararon emulsiones de Montanide ISA50V2 + Saponina como se ha indicado anteriormente, excepto que se añadió saponina QuilA™ a la fase acuosa que contenía proteína antes de la emulgación. Primero, se recogió QuilA en PBS hasta una solución al 10 % y se filtró estéril. Esto se mezcló 1:10 con una fase acuosa de antígeno en PBS, y emulsionó 50:50 con Montanide. La emulsión final contenía 500 µg/ml de Saponina.
- Se prepararon emulsiones de aceite mineral ligero, utilizando como aceite Marcol™ o Drakeol™ como emulsiones w/o (agua en aceite) 40:60 con proteínas en PBS en condiciones estándar de alta cizalla. Los tensioactivos utilizados fueron Span80™ al 5 % y Tween80™ al 1 % (en emulsión final).
- Se prepararon geles basados en alumbre con geles hidróxido de alumbre al 0,15 % (final) o fosfato de alumbre al 0,1 % y proteína en PBS.
- Se prepararon emulsiones combinadas de aceite-alumbre como combinación w/o (agua en aceite) de las composiciones descritas anteriormente, que comprenden gel de hidróxido de alumbre o de fosfato de alumbre

con antígeno en la fase acuosa y Montanide ISA50V2 en la fase oleaginosa.

2. Estudio de exposición-vacunación utilizando los antígenos Bm86 y Subolesina en un régimen de administración doble

5

2.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio fue un ensayo clínico aleatorizado utilizando terneros jóvenes (4-6 meses de vida) de la raza mixta Herford/Holstein obtenidos de un área sin garrapatas, los cuales se asignaron al azar a diferentes grupos de tratamiento a 5 animales/grupo. Excepto para el grupo de control, una dosis del artículo de ensayo contenía 100 µg de antígeno recombinante en un volumen de 1 ml de una emulsión de w/o (agua en aceite). Las inyecciones se administraron por vía subcutánea mediante inyección en la región del cuello. Los animales que fueron vacunados con más de una proteína recibieron inyecciones en distintos lugares. La vacunación inicial se reforzó 2 veces, con intervalos de tres semanas.

Tres semanas después del último refuerzo, los animales se trasladaron de un corral común a una vivienda en rediles individuales y recibieron una exposición en parches en el costado, con 2 especies de garrapatas de *Rhipicephalus*, cada uno de ellas en lados opuestos. Cada día se verificaron los lugares de infestación y se recogieron todas las hembras repletas de sangre que habían caído. Se incubó un número representativo de garrapatas recogidas para permitir la oviposición. Las masas de huevos de garrapata se incubaron posteriormente para medir la salida de larvas como una medida de viabilidad.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Artículos de ensayo

El adyuvante utilizado para este ensayo clínico fue Montanide ISA50V2 (Seppic, Francia), que se había emulsionado en una emulsión de w/o (agua en aceite) 50:50 con una fase acuosa, en condiciones convencionales. En el grupo de control, la fase acuosa consistía en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril convencional. Las vacunas contenían fases acuosas con:

- 100 µg de la proteína Bm86, producida utilizando un sistema de expresión en *Pichia*. El gen de Bm86 insertado procedía de una garrapata de *R. (Boophilus) microplus* mejicana, sin su secuencia señal nativa o región transmembrana.
- 100 µg de la proteína Subolesina, producida utilizando un sistema de expresión en *E. coli*. El gen de Subolesina insertado procedía de una garrapata de *R. (Boophilus) microplus* mejicana (147 aminoácidos) y se le proporcionó un péptido de fusión N-terminal con 6 histidinas.

Las emulsiones de vacuna se produjeron estériles y se mantuvieron en viales de vidrio a 2-8 °C hasta su uso.

40

2.2.2. Animales

Los terneros utilizados eran animales sanos, sin *Anaplasma* ni *Babesia*, y tuvieron un periodo de aclimatación de 4 semanas antes de la vacunación. Tenían una etiqueta en la oreja con un número de identificación único. Las provisiones de alimento y agua eran convencionales. Todos los animales se examinaron diariamente con respecto a cualquier tipo de anomalía por parte de un veterinario.

2.2.2. Tratamientos

Todas las vacunaciones se dieron por vía subcutánea en la región del cuello, con una dosis de 1 ml, utilizando una jeringa de 3 ml con una aguja de calibre 16. Antes de la inyección, se rasuró el lugar de inyección. Las inyecciones posteriores se dieron alternando el lado izquierdo y derecho del cuello. La vacuna doble se administró en el lado izquierdo y el derecho del cuello el mismo día.

Se realizó un muestreo de sangre cada día de vacunación, pero antes de la administración de la vacuna, y antes de la infección por exposición, se recogieron 10 ml de sangre de la vena yugular para la preparación de suero. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Se observó una hinchazón local transitoria comúnmente en el lugar de inyección de la vacuna, hasta aproximadamente 72 horas p.i.

2.2.4. Exposición a garrapatas

Las garrapatas expuestas fueron *R. (Boophilus) microplus* de un aislado de Méjico, y *R. (Boophilus) annulatus* de un aislado de Tejas. Las garrapatas se habían mantenido como colonias de laboratorio alimentándose de terneros jóvenes. Se recogieron garrapatas repletas de sangre y se incubaron para oviposición y eclosión en cámaras con

65

humedad, a un ciclo de luz – oscuridad de 12-12 horas a 22-25 °C y con una humedad relativa del 80 %.

Para la infestación por exposición a garrapatas, el ganado en el estudio se rasuró en ambos costados para instalar células de algodón con adhesivo en las que se podían colocar las larvas. Para garantizar la infestación de parches, se instaló una red protectora de algodón alrededor del lugar de inoculación. Al día siguiente, los animales fueron infestados con 250 mg (aproximadamente 5000) larvas de *R. (Boophilus) microplus* en el costado derecho y con la misma cantidad de larvas de *R. (Boophilus) annulatus* en el costado izquierdo. Las redes se mantuvieron después cerradas. Dos días después de la infestación se eliminaron las larvas no adherentes. Posteriormente, los lugares infestados se investigaron diariamente con respecto al desarrollo de garrapatas. Todas las garrapatas repletas de sangre que se habían desprendido se recogieron, se contaron, se pesaron y se incubaron en una atmósfera con humedad (80 %) a 27 °C para permitir la deposición de huevos, el desarrollo y la salida de las larvas.

2.2.5. Evaluación de resultados

15 *Títulos de anticuerpos*

La determinación de la serología animal se realizó mediante ensayo Elisa de tipo sándwich para anticuerpos como se ha descrito.

20 *Parámetros parasitológicos*

Se determinó el número total de garrapatas repletas de sangre recuperadas de cada ternero individual (y lugar de infestación) durante el periodo de infestación. Estos números fueron transformados a logaritmos para obtener conjuntos de datos normalmente distribuidos, lo que permitía realizar un análisis estadístico mediante ensayos paramétricos. Por grupo, se calcularon la media logarítmica (número de hembras repletas de sangre) y la media del promedio logarítmico del grupo. Los significados estadísticos de las diferencias de grupo se calcularon con ANOVA y Duncan por comparación en pares. La protección se calculó como la reducción en el número de garrapatas en comparación con el valor de control, expresado como un porcentaje.

El peso de cada garrapata recuperada se determinó y se expresó en gramos. La masa de huevo producida por garrapata recuperada (oviposición) se determinó y se expresó en miligramos. La viabilidad de los huevos (fertilidad) se determinó pesando la masa de las larvas recuperadas. La fertilidad se expresó como la masa larvaria con respecto a la masa del huevo y se expresó como una proporción.

El efecto final y combinado de la vacunación sobre las garrapatas de exposición y su progenie, denominado: "eficacia total", se calculó a partir de la combinación de la reducción del número de garrapatas repletas de sangre, la reducción de la masa de huevo y la reducción de la fertilidad, y se expresó como un porcentaje de reducción de la progenie viable.

40 2.3. RESULTADOS

2.3.1. Serología

La respuesta inmunitaria humoral contra los antígenos vacunados demostró ser tanto significativa, como específica de antígeno, ya que los resultados mostraron un aumento con el tiempo. La Tabla 1 presenta los valores de los títulos justo antes de la exposición.

2.3.2. Respuestas a la exposición a garrapatas

En ambos casos de infestación por exposición a la garrapata *R. (Boophilus) microplus* como a *R. (Boophilus) annulatus*, hubo una clara diferencia macroscópica en los números de garrapatas repletas de sangre entre los grupos experimentales, con una fuerte reducción de garrapatas repletas en los grupos vacunados. Diversos animales vacunados, no mostraron en absoluto garrapatas repletas, mientras que en terneros no vacunados, el número de garrapatas repletas alcanzó a veces más de 600. Para ilustrar el alcance de esta diferencia, la Figura 1 presenta fotografías de un costado de terneros de este estudio 23 días después de la exposición, uno se vacunó de manera simulada utilizando un adyuvante con PBS y el otro se vacunó tanto con Bm86 como con Subolesina en un régimen de aplicación doble.

En función del número de garrapatas repletas de sangre que pudieron recuperarse de los grupos experimentales, las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas ($p = 0,0164$, respectivamente $p = 0,0354$, en datos transformados logarítmicamente).

El % promedio total de reducción en el número de garrapatas de exposiciones a ambas especies, en comparación con los terneros vacunados de manera simulada, fue de aproximadamente 79 % en el ganado que se vacunó solo con Bm86, mientras que para los grupos que se habían vacunado con Bm86 y Subolesina, la reducción de la exposición fue de aproximadamente 97 %.

Esta protección de exposición tan impresionante, que incorpora una reducción del porcentaje de reducción en la progenie viable, se debió principalmente a la reducción en el número de garrapatas repletas de sangre: impidiendo que las garrapatas maduren a una fase adulta, esto influyó considerablemente en la capacidad de reproducción de la garrapata.

5

Tabla 1: Resultados del estudio de vacunación-exposición

Ag de Vacuna		Administración	Serología		Prot. exp. (% de reducción)
Bm86	Subolesina		(título de Ab en 2Log)		
			α Bm86	α Subolesina	
<i>Pichia</i>	--	sencilla	10,2	<7	79
<i>Pichia</i>	<i>E. coli</i>	doble	10,6	10,0	97
--	--	control	<7	<7	--

Leyenda de la Tabla 1:

- 10 Ag = antígeno; Ab = anticuerpo; prot. exp. = protección frente a exposición.
% de reducción = reducción promedio en el número de garrapatas repletas de sangre (ambas especies de exposición)

2.4. ANÁLISIS Y CONCLUSIONES

- 15 Los resultados de este estudio *in vivo* de vacunación-exposición demuestra que se puede mejorar el efecto protector de la vacunación del ganado contra la infestación de garrapatas utilizando solo el antígeno Bm86. En este estudio, el efecto protector del antígeno Bm86 se refleja en una reducción de 79% en el número de garrapatas repletas de sangre. Esta parte del estudio fue un experimento comparativo, y reprodujo el efecto que se conocía desde hace tiempo de las vacunas comerciales sencillas de antígeno Bm86, tales como TickGARD. Sin embargo, en este caso, la protección estaba por encima del nivel comúnmente observado en la técnica anterior (un 50-70 % de reducción), muy probablemente porque se utilizó una dosis más grande (100 μ g en lugar de 50 μ g) y un programa de vacunación más intenso (un total de 3 vacunaciones en lugar de 2).

- 25 Sin embargo, el efecto protector de esta vacunación sencilla puede ahora mejorarse significativamente hasta una reducción del 97 % en el número de garrapatas, cuando el ganado también se vacuna con el antígeno de Subolesina, en un régimen de administración doble. Estos resultados se obtuvieron utilizando tan solo una dosificación y formulación convencionales.

- 30 La protección a la exposición observada se correlacionó con el nivel de respuesta de anticuerpos contra los antígenos Bm86 y Subolesina. El efecto protector total (la reducción de la progenie viable) contra dos especies diferentes de garrapatas de exposición se aproximó al 100 %, que sobrepasa el nivel de especie de garrapata. En la práctica esto significará una reducción efectiva de la presión de infestación en un rebaño.

- 35 3. Estudio de serología-vacunación utilizando antígenos Bm86 y Subolesina en un régimen de administración sencillo

3.1 RESUMEN

- 40 Se realizó un estudio de vacunación *in vivo*, en gran parte similar en cuanto a configuración al descrito anteriormente, pero ahora se monitorizó la serología de los terneros como una medida de su respuesta inmunitaria y el potencial para superar una infestación de exposición. Los antígenos de la vacuna utilizados fueron las proteínas Bm86 y Subolesina, que se obtuvieron de diferentes sistemas de expresión, y se emulsionaron en diferentes conformaciones.

- 45 Cada uno de los grupos de cinco terneros se vacunó tres veces (por vía subcutánea) a intervalos de un mes. Todas las preparaciones de vacuna se formularon con el adyuvante Montanide ISA 50V2 en una emulsión de w/o (agua en aceite) al 50:50. Un grupo (T1) se vacunó con Bm86 expresada en *Pichia pastoris* y Subolesina expresada en *E. coli* formulado como vacunas separadas que se inyectaron a la izquierda y derecha en la región del cuello. El segundo grupo (T2) se trató de manera similar, pero los antígenos procedían de sistemas de expresión de baculovirus. El tercer grupo (T3) se vacunó con antígenos Bm86 y Subolesina expresados en baculovirus que se mezclaron en una sola fase acuosa antes de la formulación con adyuvante. La vacuna se dividió en dos alícuotas iguales que se inyectaron a la izquierda y a la derecha en la región del cuello. El cuarto grupo (T4) se vacunó con las proteínas Bm86 y Subolesina expresadas en baculovirus, cada una en fases acuosas separadas de una emulsión de w/o. La vacuna se dividió en dos alícuotas iguales que se inyectaron a la izquierda y a la derecha de la región del cuello. Como control, un grupo (C) se vacunó solo con adyuvante.

55

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Artículos de ensayo

5 *Grupo de ensayo 1:*

Administración doble de antígenos Bm86 y Subolesina en distintos lugares. Esto utilizó 50 µg por dosis (1 ml) de Bm86 producida en *P. pastoris* y 50 µg por dosis (1 ml) de Subolesina producida en *Escherichia coli*, inyectados en distintos lugares en el animal. La secuencia de Bm86 procedía de un aislado de garrapata australiana de *R. (Boophilus) microplus*.

Grupo de ensayo 2:

Administración doble de antígenos Bm86 y Subolesina en distintos lugares, utilizando 50 µg por dosis (1 ml) de Bm86 producida en un baculovirus y 50 µg por dosis (1 ml) de Subolesina producida en un baculovirus, inyectados en distintos lugares en el animal.

Grupo de ensayo 3:

Administración sencilla de antígenos Bm86 y Subolesina en el mismo lugar, utilizando 50 µg de Bm86 y 50 µg de Subolesina por dosis de 2 ml. Cada antígeno se produjo por baculovirus y los antígenos se combinaron después en una sola fase acuosa, se emulsionaron y después se dividieron en dos inyecciones del mismo tamaño en distintos lugares en el animal.

Grupo de ensayo 4:

Administración sencilla de antígenos Bm86 y Subolesina en el mismo lugar, utilizando 50 µg de Bm86 y 50 µg de Subolesina por dosis de 2 ml. Cada antígeno se produjo por separado mediante baculovirus y después se emulsionó en emulsiones de w/o (agua en aceite) por separado. De hecho, las emulsiones de w/o (agua en aceite) utilizadas fueron las utilizadas también para el grupo T2, y partes iguales de estas dos emulsiones w/o (agua en aceite) se mezclaron a mano poco antes de la vacunación. Esto proporcionó los dos antígenos en la misma emulsión w/o (agua en aceite), pero cada uno en una fase acuosa distinta. El volumen de la vacuna se dividió a continuación en dos inyecciones del mismo tamaño en distintos lugares en el animal.

Grupo de control:

El grupo tratado con vacuna simulada recibió inyecciones solo de adyuvante. La vacunación se administró como 2 x 1 ml en distintos lugares en el animal, para evitar influencias del lugar de inyección como tal.

3.2.2. Animales

Se utilizaron terneros de raza Ayrshire y de ambos sexos. Los terneros tenían aproximadamente 3 meses de vida, y desde el punto de vista clínico estaban sanos. Los animales se pesaron durante el periodo de aclimatación, y se asignaron a los grupos de tratamiento por selección aleatoria de grupos clasificados por peso. El resultado final fue una distribución aleatoria de animales en grupos de tratamiento de pesos medios similares (aproximadamente 80 kilos).

Para todas las vacunas y para el control, la aplicación se realizó por inyección subcutánea, en el cuello medio caudolateral, en lados contralaterales, y a un volumen de dosis de 1 ml por lugar de inyección.

3.2.3. Análisis estadístico

Todos los datos de los títulos de los anticuerpos se transformaron logarítmicamente para garantizar mayor normalidad del conjunto de datos. Esto permitió utilizar un análisis estadístico paramétrico de valores grupales. Como resultado, todas las medias calculadas son medias geométricas a menos que se indique otra cosa.

3.2.4. Recogida y procesamiento de sangre

Las muestras de sangre de todos los grupos se recogieron semanalmente durante un máximo de 18 semanas. En tubos de suero, se recogieron aproximadamente 10 ml de sangre de la vena yugular izquierda o derecha. Después de la formación del coágulo, las muestras de sangre se centrifugaron y el suero de cada tubo se decantó o transfirió con pipeta a criotubos marcados. Las muestras de suero se conservaron después a aproximadamente -40 °C, se transportaron en hielo seco para análisis Elisa de los títulos de anticuerpos específicos de Bm86 y Subolesina.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Seroconversión

5 Utilizando el ensayo de Elisa para la captura de anticuerpos, se midió la respuesta de los anticuerpos de los terneros contra las proteínas que se utilizaron para la inmunización. Dependiendo de la formulación de la vacuna, se encontraron diferentes respuestas de anticuerpos contra cada uno de los antígenos. Los títulos de anticuerpos contra Bm86, 2 semanas después del segundo refuerzo, fueron generalmente bajos en todos los grupos de los animales vacunados, que variaba entre 7,2 y 10,8 (en títulos Elisa arbitrarios de Log2). Los títulos más altos de anticuerpos se encontraron en los terneros del grupo T3, seguido de los del grupo T4, T1 y T2 en orden descendente (Tabla 2).

15 Los títulos más altos de anticuerpos contra Subolesina se encontraron en los terneros del grupo T1, seguido de los del grupo T4, T2 y T3 en orden descendente. Cabe destacar, que puesto que cada uno de los antígenos Bm86 y Subolesina, utilizados para vacunar a los animales de los grupos T2, T3 y T4, procedían de un solo lote, las diferencias en los títulos de anticuerpos entre estos grupos están relacionadas con la formulación de la vacuna. Cuando los antígenos se mezclaron en la fase acuosa antes de la emulsificación en el adyuvante oleaginoso (grupo T3), la respuesta contra Subolesina fue marginal, aunque la respuesta contra Bm86 se incrementó. Dicha interferencia de la respuesta contra estos antígenos no se encontró cuando cada uno de los antígenos se formuló en su propia fase acuosa (grupo T4); la respuesta de este grupo fue muy similar a la del ganado que se vacunó con estos antígenos como vacunas de administración doble (grupo T2).

25 La respuesta del ganado contra el antígeno Bm86 producido en *Pichia* (grupo T1), fue similar a la del ganado que recibió Bm86 producido por baculovirus (grupo T2). Sin embargo, la respuesta del ganado contra el antígeno Subolesina producido por *E. coli* fue mucho mayor que la del ganado que se vacunó con Subolesina producido por baculovirus (grupo T2; $p = 0,05$, Anova unidireccional/Duncan).

Tabla 2: Resultados del estudio de vacunación-serología

Grupo	Ag de Vacuna		Administración	Serología	
	Bm86	Subolesina		(Título de Ab en 2Log)	
				α Bm86	α Subolesina
T1	<i>Pichia</i>	<i>E. coli</i>	doble	8,6	12,3
T2	baculo	baculo	doble	8,2	9,8
T3	baculo	baculo	sencilla - combinada	9,7	8,2
T4	baculo	baculo	sencilla - separada	8,9	9,6
C	--	--	control	7,2	7,3

30 3.4. ANÁLISIS Y CONCLUSIONES

En este estudio serológico *in vivo*, se ensayaron varios aspectos de una vacunación combinada de Bm86 y Subolesina:

35 En primer lugar se estudió el efecto de la combinación de los dos antígenos Bm86 y Subolesina en una forma de dosificación sencilla. Los resultados muestran que cuando los dos antígenos, Bm86 y Subolesina, se combinan en una sola fase acuosa (T3), entonces Subolesina no se reconoce bien, y la respuesta inmunitaria fue sesgada hacia la producción de anticuerpos contra Bm86. En este grupo, la respuesta de anticuerpos contra Bm86 fue estadísticamente significativa más alta que la del ganado vacunado con cada uno de los antígenos formulados como administración separada (T1, T2). Por el contrario, la respuesta de anticuerpos contra el antígeno Subolesina fue menor que la del ganado vacunado con los dos antígenos por separado. Este efecto es desfavorable: aunque puede ser positivo tener una mayor respuesta de anticuerpos contra Bm86, esto solo proporcionará una protección parcial a la exposición. Como se demostró en los estudios de vacunación-exposición (Ejemplo 2), una fuerte respuesta protectora requiere altos niveles de anticuerpos contra ambos antígenos, Bm86 y Subolesina. Por lo tanto, con una reducción del título de Subolesina, resultante de la mezcla directa de los dos antígenos, no puede obtenerse una inmunoprotección que sea eficaz.

45 Sin embargo, excepcionalmente, cuando cada uno de estos antígenos estaba presente en una fase acuosa separada (T4), no se encontró interferencia o sesgo de la respuesta de anticuerpos, y tanto Bm86 como Subolesina indujeron un título aceptable de anticuerpos específicos. Esto se parecía mucho a la respuesta observada después de la administración doble (T2). En consecuencia, esto demostró que en principio es posible generar respuestas de anticuerpos contra cada uno de los dos antígenos utilizando solo un único régimen de administración de vacunas, pero se requiere un cuidado especial con respecto a su presentación como entidades separadas al sistema inmunitario de la diana.

55 Un segundo objetivo fue evaluar el efecto del sistema de expresión. Por lo tanto, la proteína Bm86 recombinante se produjo por expresión en *Pichia* o por baculovirus, y la Subolesina se produjo en *E. coli* o por baculovirus. Fue tranquilizador encontrar que todos los sistemas de expresión utilizados producían cantidades aceptables de

antígeno, sin requisitos especiales. Utilizando un ensayo Elisa convencional de masa antigénica, se evaluaron las cantidades relativas de antígeno producido, y la cantidad Bm86 seleccionada fue de aproximadamente 50 µg, lo que igualó la dosis utilizada en el estudio del Ejemplo 2.

5 Para la vacunación del antígeno Subolesina, se utilizaron 50 µg por dosis, que era aproximadamente la mitad de la cantidad utilizada en el estudio anterior. La respuesta serológica contra el antígeno Subolesina producido en *E. coli* fue mejor que la de contra Subolesina producido por baculovirus. Las respuestas de anticuerpos contra Bm86 fueron también algo menores que en el ensayo clínico anterior. No quedó inmediatamente claro por qué, pero esto no estaba relacionado con el sistema de expresión elegido, ya que la respuesta de anticuerpos contra Bm86 obtenida con antígeno producido por baculovirus era comparable a la que tenía después de la inmunización con antígeno producido en *Pichia*.

10 Se llegó a la conclusión de que el sistema de expresión no es crítico pero que había espacio para mejorar los niveles de títulos de anticuerpos protectores obtenidos basándose, por ejemplo, en estudios de optimización para la dosis de antígeno y el tipo de adyuvante.

15 4. Ensayos de alimentación de garrapatas *in vitro*:

20 Se establecieron ensayos de alimentación artificial de garrapatas de *Rhipicephalus*, que se alimentaban de muestras ensayo de sangre bovina, como una forma de posibilitar la evaluación de la capacidad protectora a la exposición de los niveles de anti-Bm86 y/o anti-Subolesina en muestras de sangre. Los ensayos tenían como objetivo detectar una diferencia en el número de garrapatas que estaban repletas de sangre, con respecto al número total de garrapatas dispuestas para alimentarse de una muestra de sangre específica, y correlacionarlo con el título de antígeno de la muestra de sangre ensayada.

25 El uso de estos ensayos ayudó a reducir el número de animales de experimentación requeridos. Además, los ensayos *in vitro* demostraron ser una manera rápida y fiable de evaluar la protección contra la exposición a las garrapatas, ya que está directamente relacionada con los niveles de anticuerpos contra Bm86 y Subolesina en la sangre.

30 4.1. MÉTODOS

Los ensayos se realizaron utilizando dispositivos de construcción propia, basados en la descripción de Kröber y Guerin (1007, Trends in Paras, vol. 23, pág. 445) utilizando un conjunto de placas de 24 pocillos. Las larvas de garrapatas de *Rhipicephalus* se obtuvieron eclosionando huevos de hembras adultas que se mantuvieron en una colonia de laboratorio, en condiciones estándar. Cuando tenían aproximadamente 3 semanas de vida, se colocaron aproximadamente 0,3 gramos de larvas en un líquido transportador de 50 µl por pocillo, esto representó 50-100 larvas; y cada muestra se ensayó en 6 pocillos. Las cámaras de ensayo estaban cubiertas en un lado con una red para impedir el escape, y en el otro lado con una membrana de alimentación que proporciona acceso a una muestra de sangre o suero. Después, las larvas atravesaron la membrana con sus partes bucales y se alimentaron de la sangre, de manera similar a la situación natural. La muestra de ensayo se mezcló con un antibiótico y con un compuesto antifúngico para su conservación. Después, los dispositivos de ensayo se colocaron en cámaras de incubación con CO₂ convencionales a 37 °C, CO₂ 5 %, y humedad relativa de 80 %.

45 Después de la incubación durante aproximadamente 72 horas, las cámaras se colocaron a -20 °C para destruir las larvas y después se realizó un estudio al microscopio. La puntuación se realizó decidiendo si una garrapata estaba claramente o no repleta de sangre, y contando los números de estos grupos en cada cámara de ensayo. Es importante destacar que la persona que realizaba la puntuación desconocía la información de fondo de las muestras de sangre o suero que se ensayaron. Estos recuentos dieron un número final del porcentaje de garrapatas que estaban repletas después de alimentarse sobre una muestra específica.

50 4.2. RESULTADOS

Se encontró que en los resultados de los ensayos de alimentación artificial de las garrapatas, cualquier reducción en el número de garrapatas repletas para una muestra específica de sangre o suero analizada, se correlacionaron bien con el título de anticuerpo de Bm86 o Subolesina de las muestras ensayadas. La Figura 2 representa los resultados de ensayar sueros bovinos en los sueros de alimentación artificial de las garrapatas. Los bovinos se habían inmunizado con antígeno Bm86 o con Subolesina en estudios de búsqueda de dosis y de optimización de adyuvante, como se describe a continuación. En el ensayo particular mostrado en la Figura 2, los sueros se obtuvieron después de 2 vacunaciones.

60 Para ensayar el efecto simultáneo en una garrapata por anticuerpos contra Bm86 y Subolesina, las muestras de suero que contenían estos anticuerpos se mezclaron individualmente a una proporción 1:1. Para una comparación exacta, las muestras del ensayo solo con anticuerpos Bm86 o solo con anticuerpos Subolesina también se diluyeron a una proporción 1:1, utilizando suero de ternero a partir del día 0 (tomado antes de la vacunación). Se estableció que el número de garrapatas repletas encontrado en la muestra de suero del día 0, representaba una inhibición de 0 %.

Los resultados indican un fuerte aumento en la inhibición de la voracidad de las garrapatas por los antisueros Bm86 y Subolesina combinados. La diferencia entre las inhibiciones inducidas por el único antisuero Bm86 o por el único antisuero de Subolesina no fue estadísticamente significativa.

Estos resultados reflejan una vez más el efecto acumulativo que puede obtenerse sobre la voracidad de la garrapata cuando en la sangre ingerida por la garrapata hay niveles suficientemente altos de anticuerpos contra Bm86 y Subolesina.

5. Estudios de optimización de la vacuna:

Se han realizado diversos estudios de vacunación *in vivo* para ensayar diversas dosis de antígeno y para optimizar las emulsiones y los adyuvantes utilizados. Los estudios se evaluaron mediante serología y pruebas en ensayos de alimentación artificial de garrapatas. Los estudios dieron como resultado formulaciones que indujeron niveles muy altos de anticuerpos.

Una estrategia era ensayar el uso de la Saponina como un adyuvante incluido en la fase acuosa de las emulsiones de vacuna. La saponina actuará entonces además del efecto adyuvante que ya está inducido por la fase oleaginosa estándar utilizada para preparar las emulsiones según la invención. En estos estudios las proteínas se utilizaron a niveles subóptimos, por lo que cualquier efecto de adyuvación adicional destacaría más. En paralelo, se realizaron estudios de determinación de dosis para ensayar el efecto de diferentes cantidades de antígeno.

Para todos estos estudios, la configuración básica fueron ensayos en grupos de 5 terneros (6-8 meses de vida, raza Frysian/Holstein, de sexo mixto), que fueron vacunados y después recibieron un refuerzo al cabo de 6 semanas. El suero se ensayó semanalmente.

Para Bm86: se utilizaron cantidades de antígeno de 25, 50, 100 y 200 µg/dosis. Se ensayaron diferentes formulaciones con 50 µg de Bm86/dosis. Las diferentes formulaciones de w/o ensayadas se prepararon con: Montanide ISA 50V2; Montanide ISA 50V2 + Saponina; Aceite Mineral Blanco; gel de hidróxido de alumbre; o gel de fosfato de alumbre. El antígeno Bm86 se había expresado mediante un sistema de expresión de baculovirus como se ha descrito.

Para la Subolesina: se utilizaron cantidades de antígeno de 12,5, 25, 50 y 100 µg/dosis. Las diferentes formulaciones (los mismos tipos que se utilizaron para Bm86) se ensayaron con 25 µg de antígeno de Subolesina. El antígeno de Subolesina se había expresado mediante un sistema de expresión de *E. coli* con una etiqueta de His N terminal, como se ha descrito.

No se necesitaron grupos de vacunación simulados, ya que se había establecido que no desarrollaron anticuerpos relevantes.

Para ambos antígenos, las serorespuestas más altas se encontraron utilizando los adyuvantes Montanide ISA 50V2 + Saponina, o gel de fosfato de alumbre. Esto podría explicarse investigando los perfiles de IgG, que demostraron que mediante estos adyuvantes, se generó una respuesta de anticuerpo IgG2a además de una respuesta de anticuerpo IgG1, aumentado con ello el nivel total de anticuerpos específicos producidos.

Los niveles de anticuerpos más altos de los estudios de determinación de dosis de antígeno fueron, para Bm86 de 50 µg/dosis y para Subolesina de 100 µg/dosis.

Utilizando los ensayos Elisa de anticuerpo estándar, los títulos máximos de anticuerpos obtenidos en estos estudios de optimización se determinaron como: para Bm86: 19 Log2 unidades Elisa, y para Subolesina: 18 Log2 unidades Elisa.

Teniendo en cuenta que estos niveles de anticuerpos en las dianas vacunadas están muy por encima de los niveles de aproximadamente 10Log2 unidades Elisa (como se aplica en estos experimentos) que demostraron ser protectores en el estudio de vacunación-exposición, se consideró que dichos animales vacunados estaban protegidos de manera eficaz.

Los sueros de estos estudios se utilizaron para los ensayos de alimentación de garrapatas *in vitro* descritos anteriormente.

6. Estudio ininterrumpido de vacunación *in vivo* utilizando vacunas optimizadas

Un estudio de vacunación *in vivo* es ininterrumpido, en el cual las formulaciones de vacuna con el adyuvante óptimo serán ensayadas en combinación con las dosis óptimas de antígeno. Utilizando esencialmente la misma configuración que la de los estudios de optimización, se inmunizarán 6 grupos de 5 terneros con diferentes vacunas y se monitorizará su respuesta inmunoserológica. Los grupos de ensayo son:

- Solo Bm86:

50 µg/dosis de antígeno Bm86, expresado por baculovirus, formulado en Montanide ISA 50 V2 con saponina.

- Solo Subolesina:

50 µg/dosis de antígeno Subolesina, expresado en *E. coli*, formulado en Montanide ISA 50 V2 con saponina.

- Bm86 + Subolesina doble:

50 µg/dosis de antígeno Bm86, expresado por baculovirus, formulado en Montanide ISA 50 V2 con saponina administrado en un lado; y simultáneamente, administrado al otro lado: 50 µg/dosis de antígeno de Subolesina, expresado en *E. coli*, formulado en Montanide ISA 50 V2 con saponina.

- Bm86 + solo Subolesina, fases acuosas separadas, 3 grupos:

Antígeno Bm86, expresado por baculovirus, junto con saponina en una fase acuosa de una emulsión w/o basada en Montanide ISA 50 V2; y en otra fase acuosa de la misma emulsión w/o: antígeno Subolesina, expresado en *E. coli*, junto con saponina. Esta formulación se ensayará con tres combinaciones de cantidades de cada uno de los antígenos: 25, 50 o 100 µg/ml de cada uno de Bm86 o Subolesina.

La vacuna de administración sencilla que comprende ambos antígenos, pero en fases acuosas separadas, se preparará mezclando, poco antes de la vacunación, los mismos volúmenes de las vacunas w/o sencillas de Bm86 y de Subolesina.

7. Estudio de vacunación planificado *in vivo* utilizando vacunas optimizadas

Se están planificando estudios de vacunación *in vivo* adicionales con la finalidad de desarrollar productos. Estos tendrán esencialmente la misma configuración pero incluirán una infestación de exposición *in vivo* a las garrapatas. Las vacunas empleadas utilizarán la dosificación optimizada y la formulación de los antígenos Bm86 y Subolesina, como se determinó en los estudios anteriores. También confirmarán la necesidad de presentar las proteínas Bm86 y Subolesina por separado al sistema inmunitario de una diana.

Leyenda de las figuras

Figura 1:

Efecto de la vacunación con los antígenos Bm86 y Subolesina sobre el número de garrapatas *R. (Boophilus) microplus* repletas de sangre.

Las fotografías son desde el centro del lado lateral de vacas que fueron sometidas a una infestación por exposición con larvas de *R. (Boophilus) microplus*, 23 días después de la exposición.

Panel superior: Vacunación con control adyuvante
Panel inferior: Ternero vacunado, que recibió antígenos de Bm86 y Subolesina en una administración doble. En este animal se observó una atenuación completa.

La red que es visible es para mantener la infestación por exposición localizada como un parche.

Figura 2:

Resultados de un ensayo de alimentación artificial de garrapatas, que representa el nivel de inhibición de voracidad de las garrapatas que se obtuvo utilizando una muestra de suero procedente de bovinos después de dos vacunaciones con antígeno Bm86 o Subolesina.

Muestras:

día 0: suero antes de la vacunación
Bm86: suero después de la vacunación y refuerzo con antígeno Bm86, mezclado a una proporción 1:1 con suero día 0;
Subolesina: ídem, vacunado y reforzado con antígeno Subolesina, también a una proporción 1:1 con suero día 0;
Bm86+Subo: combinación 1:1 de los sueros Bm86 y Subolesina.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Intervet International BV

<120> Vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus*

ES 2 643 031 T3

<130> 23494

<160>2

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 608

<212> PRT

10 <213> *Rhipicephalus microplus*

<400> 1

```

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

```

ES 2 643 031 T3

Ser Pro Lys Gly Pro Asp Gly Gln Cys Lys Asn Ala Cys Arg Thr Lys
180 185 190

Glu Ala Gly Phe Val Cys Lys His Gly Cys Arg Ser Thr Asp Lys Ala
195 200 205

Tyr Glu Cys Thr Cys Pro Ser Gly Ser Thr Val Ala Glu Asp Gly Ile
210 215 220

Thr Cys Lys Ser Ile Ser Tyr Thr Val Ser Cys Thr Val Glu Gln Lys
225 230 235 240

Gln Thr Cys Arg Pro Thr Glu Asp Cys Arg Val Gln Lys Gly Thr Val
245 250 255

Leu Cys Glu Cys Pro Trp Asn Gln His Leu Val Gly Asp Thr Cys Ile
260 265 270

Ser Asp Cys Val Asp Lys Lys Cys His Glu Glu Phe Met Asp Cys Gly
275 280 285

Val Tyr Met Asn Arg Gln Ser Cys Tyr Cys Pro Trp Lys Ser Arg Lys
290 295 300

Pro Gly Pro Asn Val Asn Ile Asn Glu Cys Leu Leu Asn Glu Tyr Tyr
305 310 315 320

Tyr Thr Val Ser Phe Thr Pro Asn Ile Ser Phe Asp Ser Asp His Cys
325 330 335

Lys Arg Tyr Glu Asp Arg Val Leu Glu Ala Ile Arg Thr Ser Ile Gly
340 345 350

Lys Glu Val Phe Lys Val Glu Ile Leu Asn Cys Thr Gln Asp Ile Lys
355 360 365

Ala Arg Leu Ile Ala Glu Lys Pro Leu Ser Lys Tyr Val Leu Arg Lys
370 375 380

Leu Gln Ala Cys Glu His Pro Ile Gly Glu Trp Cys Met Met Tyr Pro
385 390 395 400

Lys Leu Leu Ile Lys Lys Asn Ser Ala Thr Glu Ile Glu Glu Glu Asn
405 410 415

Leu Cys Asp Ser Leu Leu Lys Asn Gln Glu Ala Ala Tyr Lys Gly Gln
420 425 430

ES 2 643 031 T3

Asn Lys Cys Val Lys Val Asp Asn Leu Phe Trp Phe Gln Cys Ala Asp
 435 440 445

Gly Tyr Thr Thr Thr Tyr Glu Met Thr Arg Gly Arg Leu Arg Arg Ser
 450 455 460

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

Ala Asn Lys Gly Gln Ile Cys Val Tyr Glu Asn Gly Lys Ala Asn Cys
 485 490 495

Gln Cys Pro Pro Asp Thr Lys Pro Gly Glu Ile Gly Cys Ile Glu Arg
 500 505 510

Thr Thr Cys Asn Pro Lys Glu Ile Gln Glu Cys Gln Asp Lys Lys Leu
 515 520 525

Glu Cys Val Tyr Lys Asn His Lys Ala Glu Cys Lys Cys Pro Asp Asp
 530 535 540

His Glu Cys Ser Arg Gln Pro Ala Lys Asp Ser Cys Ser Glu Glu Asp
 545 550 555 560

Asn Gly Lys Cys Gln Ser Ser Gly Gln Arg Cys Val Met Glu Asn Gly
 565 570 575

Asn Ala Val Cys Lys Glu Lys Ser Glu Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr
 580 585 590

Thr Thr Lys Ala Lys Asp Lys Asp Pro Asp Pro Gly Lys Ser Ser Ala
 595 600 605

<210> 2
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> *Rhipicephalus microplus*
 <400> 2

5

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

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

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

10

ES 2 643 031 T3

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

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

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

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

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

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

Tyr Asp Gln
145

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende una primera y una segunda proteínas aisladas, en la que la primera proteína aislada es una proteína Bm86 o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 71 % con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, y en la que la segunda proteína aislada es una proteína Subolesina o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 96 % con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2, y en la que las dos proteínas están físicamente separadas entre sí.
- 10 2. Una composición según la reivindicación 1, en donde la composición es una emulsión de agua en aceite que comprende una fase oleaginosa continua y al menos dos fases acuosas separadas, en donde una de las fases acuosas comprende la primera proteína aislada como se describe en la reivindicación 1 y otra fase acuosa comprende la segunda proteína aislada como se describe en la reivindicación 1.
- 15 3. Una composición según la reivindicación 1, en donde la composición es una emulsión de agua en aceite en agua que comprende una fase acuosa externa continua, que comprende una fase oleaginosa, fase oleaginosa que comprende al menos una fase acuosa interna y en la que una proteína seleccionada de la primera y la segunda proteínas aisladas, como se describen en la reivindicación 1, está comprendida en la fase acuosa externa y la otra proteína de la primera y la segunda proteínas aisladas, como se describen en la reivindicación 1, está comprendida en una fase acuosa interna.
- 20 4. Una composición según la reivindicación 1, en la que cada una de la primera y la segunda proteínas aisladas, como se describen en la reivindicación 1, está comprendida en vehículos farmacéuticos separados.
- 25 5. Una composición según la reivindicación 4, en la que al menos uno de los vehículos farmacéuticos es un compuesto de alumbre o una estructura macromolecular.
- 30 6. Método de preparación de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende las etapas de:
- preparar soluciones o vehículos farmacéuticos que comprenden la primera o la segunda proteínas aisladas como se describen en la reivindicación 1, y
 - combinar estas soluciones y/o vehículos farmacéuticos en una composición, de manera que la composición comprende tanto la primera como la segunda proteínas aisladas como se describen en la reivindicación 1.
- 35 7. Método según la reivindicación 6, en el que la primera etapa comprende las etapas de:
- expresar una secuencia de ácido nucleico que codifica la primera o la segunda proteínas aisladas en un sistema de expresión, y
 - recoger y aislar la proteína expresada.
- 40 8. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso como una vacuna contra las garrapatas de *Rhipicephalus*.
- 45 9. Vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus*, que comprende una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un constituyente farmacéuticamente aceptable.
- 50 10. Método de preparación de una vacuna contra garrapatas de *Rhipicephalus*, que comprende mezclar una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un constituyente farmacéuticamente aceptable.
- 55 11. La proteína Bm86 o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 71 % con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, en combinación con una proteína de Subolesina o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 96 % con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2, para su uso en la vacunación de una diana contra garrapatas de *Rhipicephalus*, **caracterizada por que** las proteínas se administran simultáneamente pero en diferentes lugares del cuerpo, por vías diferentes o por métodos diferentes.
- 60 12. La proteína Subolesina o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 96 % con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2, en combinación con una proteína Bm86 o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 71 % con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, para su uso en la vacunación de una diana contra garrapatas de *Rhipicephalus*, **caracterizada por que** las proteínas se administran simultáneamente pero en diferentes lugares en el cuerpo, por vías diferentes o por métodos diferentes.
- 65

- 5 13. Un kit de componentes que comprende al menos dos envases, en el que un envase comprende una proteína Bm86 o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 71 % con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, y otro envase comprende una proteína Subolesina o un homólogo de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 96 % con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2.

Figura 1

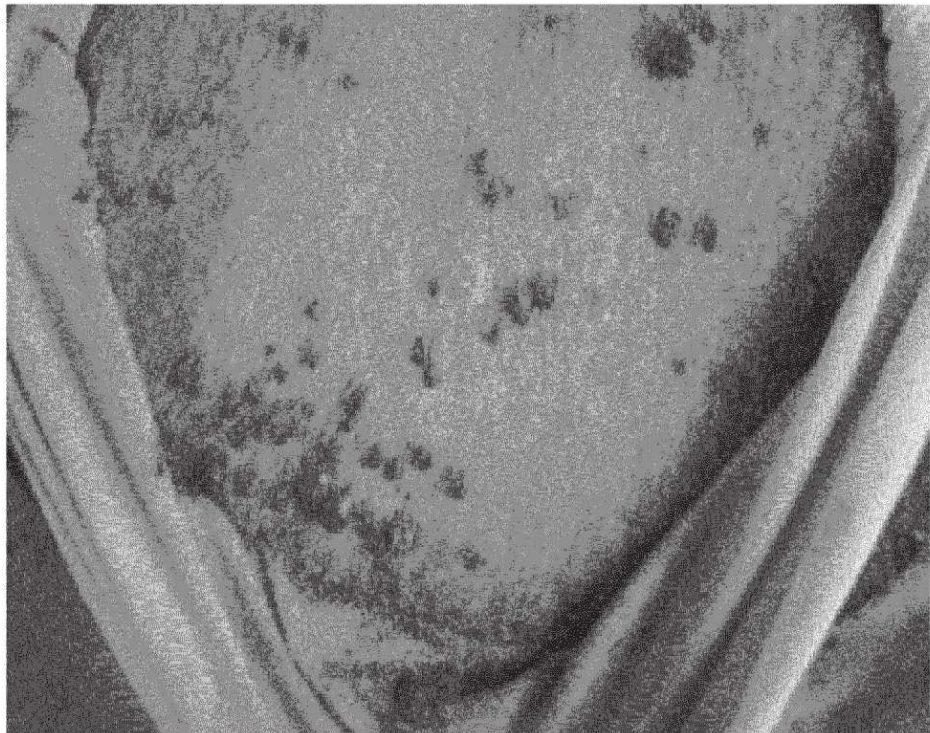


Figura 2

