

# MÓDULOS INMUNOGÉNICOS VERSÁTILES Y NANOPARTÍCULAS PARA VACUNAS CONTRA GARRAPATAS

## ANTECEDENTES

### Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones y métodos para conferir inmunidad y prevenir, controlar o reducir las infestaciones por garrapatas y la transmisión de patógenos transmitidos por garrapatas. La invención se refiere a proteínas recombinantes multiméricas autoensamblantes, composiciones inmunogénicas, vacunas, métodos para modificar genéticamente y producir dichas proteínas recombinantes multiméricas autoensamblantes y sus aplicaciones para inmunoterapia.

### Discusión de la técnica relacionada

Las garrapatas son artrópodos hematófagos y se encuentran en todo el mundo, especialmente en los países tropicales y subtropicales. Como ectoparásitos, las garrapatas son vectores de bacterias y virus que causan enfermedades a humanos y animales y son responsables de inducir reacciones alérgicas e inmunológicas. Se sabe que las garrapatas infestan una amplia gama de huéspedes, desde reptiles, aves hasta mamíferos, incluidas mascotas y ganado.

En el ganado, las garrapatas pueden transmitir patógenos como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*, agentes etiológicos de la tristeza del parásito bovino. Además de las enfermedades transmitidas por garrapatas, la infestación por garrapatas causa pérdida de peso, problemas de salud de las ubres y problemas de producción de leche en el ganado, lo que provoca importantes pérdidas económicas. *Rhipicephalus microplus*, comúnmente conocida como garrapata del ganado, es la garrapata más prevalente que afecta al ganado. Las estrategias actuales destinadas a combatir *R. microplus* incluyen el manejo de rebaños y el uso de productos químicos como acaricidas y lactonas macrocíclicas. Desafortunadamente, las poblaciones de garrapatas han desarrollado resistencia a dichos compuestos debido a su uso ubicuo en el control de garrapatas. Además, los productos químicos causan riesgos potenciales para el medio ambiente, la carne y la leche cuando se aplican incorrectamente.

En consecuencia, la vacunación proporciona una alternativa atractiva a los acaricidas químicos por su seguridad y rentabilidad. Desde los primeros ensayos de vacunación con extractos crudos de garrapatas en 1939, se han identificado varios antígenos proteicos derivados de garrapatas como posibles candidatos a vacunas. La lista de antígenos incluye procatepsina, vitelina, cisteína endopeptidasa degradante, glicoproteína 80, inhibidores de tripsina de larvas, 5'-nucleotidasa, ferritina 2, ubiquitina, factor de elongación 1 alfa, proteína de superficie principal 1a (MSP1a), glutatión S-transferasas, proteína de seda flageliforme, receptor de garrapatas para la proteína de superficie externa A, reprotisina, metaloproteasa 4, acuaporina 1 (RmAQP1), proteína ribosómica P0 (pP0), proteínas de las glándulas salivales tales como subolesina, acirina, 05 (Bm05), 39 (Bm39), 76

(Bm76), 91 (Bm91), 180 (Rm180), 239 (Rm239) y proteínas intestinales: 86 (Bm86), 95 (Bm95), ATAQ. Sin embargo, las deficiencias están asociadas con la mayoría de las vacunas recombinantes de la técnica anterior, incluida la baja eficacia, la alta variabilidad genética entre las poblaciones de garrapatas, el alto costo de fabricación y la formación de cuerpos de inclusión que pueden impedir la producción de proteínas recombinantes solubles y funcionales esenciales para la eficacia de la vacuna. Existe una necesidad insatisfecha de diseñar nuevos inmunógenos para vacunas que induzcan una protección inmunitaria potente y duradera contra las infestaciones de garrapatas. También existe la necesidad de vacunas mejoradas que se puedan producir fácilmente, que sean eficaces y seguras, y que puedan inducir una protección a largo plazo contra un amplio espectro de especies de garrapatas.

## **COMPENDIO DE LA INVENCION**

La invención se refiere a inmunógenos, nanopartículas inmunogénicas, composiciones inmunogénicas, vacunas y métodos para controlar, prevenir y tratar infestaciones de garrapatas en animales, incluidos mamíferos domésticos, ganado o aves. La invención también se refiere a un método mejorado para producir inmunógenos y vacunas contra garrapatas. Dichos inmunógenos comprenden módulos derivados de Bm86 recombinantes (por ejemplo, Bm86Dock o variantes de este) que muestran epítomos capaces de inducir una respuesta inmunitaria protectora, que incluye la producción de anticuerpos neutralizantes. Ventajosamente, los inmunógenos Bm86Dock o variantes de estos se muestran en andamios de proteínas multiméricas autoensamblables que forman nanopartículas Bm86Dock inmunogénicas (Bm86Dock-NP). Cuando se administran a mamíferos o aves, los inmunógenos Bm86Dock o variantes de estos confieren una potente inmunidad y una protección duradera contra las garrapatas. Las formulaciones de vacuna que comprenden inmunógenos Bm86Dock o variantes de estos se pueden formular adicionalmente con adyuvantes tales como oxihidróxido de aluminio (AlOH).

Aspectos adicionales de la presente descripción se proporcionan por la materia de las siguientes modalidades.

En la presente se proporciona un módulo Bm86Dock recombinante aislado derivado de la proteína Bm86 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y variantes de esta, o una secuencia de aminoácidos que tiene un fragmento inmunogénico que consiste en la SEQ ID NO: 1. El módulo Bm86Dock recombinante provoca una respuesta inmunitaria.

El módulo Bm86Dock recombinante aislado de la modalidad anterior, comprende un fragmento inmunogénico que consiste en SEQ ID NO: 1.

También se proporciona en la presente un inmunógeno de Bm86Dock para tratar, controlar o prevenir una infestación por garrapatas en un sujeto que incluye: un módulo de Bm86Dock recombinante de una proteína Bm86 que incluye una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consta

de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, y variantes de esta; y una etiqueta peptídica y un compañero de unión peptídico derivado de una proteína iso-peptídica. El módulo Bm86Dock recombinante provoca una respuesta inmunitaria en el sujeto.

El módulo Bm86Dock recombinante de cualquier modalidad anterior puede incluir al menos un fragmento inmunogénico que consiste en la SEQ ID NO: 1.

La etiqueta peptídica y el compañero de unión peptídica de cualquiera de las modalidades anteriores se seleccionan del grupo que consta de SpyTag/SpyCatcher, SpyCatcherΔN1, SpyCatcherΔN2, SpyCatcherΔN3, SpyCatcherΔN1C1, SpyCatcherΔN1C2, SpyTag002/SpyCatcher002, SpyTag003/SpyCatcher003, SdyTag/SdyCatcher, DogTag/DogCatcher, SnoopTag/SnoopCatcher y SilkTag/SilkCatcher.

La etiqueta peptídica de cualquiera de las modalidades anteriores incluye la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4.

El compañero de unión al péptido de cualquiera de las modalidades anteriores puede incluir la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7.

En la presente también se proporciona un vector de expresión que incluye el módulo Bm86Dock recombinante o el inmunógeno Bm86Dock de cualquiera de las modalidades anteriores.

En la presente se proporciona además un nanopartícula Bm86Dock- inmunogénica (Bm86Dock-NP) que incluye: un andamiaje proteico multimérico autoensamblante compuesto por una pluralidad de subunidades polipeptídicas y una pluralidad de inmunógenos. Cada inmunógeno se conjuga con una subunidad polipeptídica de la pluralidad de subunidades polipeptídicas. Cada inmunógeno de la pluralidad de inmunógenos comprende un módulo recombinante (Bm86Dock) de una proteína Bm86 que incluye una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consta de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, y variantes de esta. El Bm86Dock-NP provoca una respuesta inmunitaria en el sujeto.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de la modalidad anterior, caracterizado porque un inmunógeno o al menos uno de una pluralidad de inmunógenos se muestra en la superficie externa del andamiaje de proteína multimérica autoensamblable.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores, caracterizado porque el inmunógeno muestra al menos un epítipo lineal y/o al menos un epítipo conformacional del módulo Bm86Dock nativo.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de las modalidades anteriores, caracterizado porque el al menos un epítipo lineal y/o el al menos un epítipo conformacional es reconocido por anticuerpos protectores o neutralizantes.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores, caracterizado porque

el andamiaje de proteína multimérica autoensamblable tiene una simetría icosaédrica, una simetría dodecaédrica, una forma anular o una forma cilíndrica.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores, caracterizado porque la subunidad polipeptídica se deriva de una proteína multimérica autoensamblante del grupo que incluye lumazina sintasa (LS), ferritina, glicoproteína de la envoltura del HCV E2, proteína de la membrana externa de *Brucella* BP26, péptido del anillo  $\beta$ , AP205, encapsulina, sHSP, CCMV, bacteriófago P22, I3-01, I3-01 mutado (mi3), I32-19, I32-58 e I53-50.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores, caracterizado porque el andamiaje de proteína multimérica de autoensamblaje se compone de al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 20, al menos 24, al menos 60, al menos 120, al menos 180, al menos 240 subunidades de polipéptido. En algunas modalidades, el andamiaje de proteína multimérica de autoensamblaje se compone de 24 subunidades de polipéptidos. En algunas modalidades, el andamiaje de proteína multimérica autoensamblable se compone de 60 subunidades de polipéptidos.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores, caracterizado porque cada inmunógeno se conjuga con su subunidad polipeptídica a través de un enlace isopeptídico formado entre un péptido etiqueta y un compañero de unión peptídico.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de las modalidades anteriores, caracterizado porque el péptido marcador se fusiona a cada inmunógeno y el compañero de unión al péptido se fusiona a cada subunidad polipeptídica del armazón de proteína multimérica autoensamblante.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de las modalidades anteriores, caracterizado porque el péptido marcador se fusiona a cada subunidad polipeptídica del armazón de proteína multimérica de autoensamblaje y el compañero de unión peptídico se fusiona a cada inmunógeno.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores, caracterizado porque la etiqueta peptídica/pareja de unión peptídica se selecciona del grupo que incluye SpyTag/SpyCatcher, SpyCatcher $\Delta$ N1, SpyCatcher $\Delta$ N2, SpyCatcher $\Delta$ N3, SpyCatcher $\Delta$ N1C1, SpyCatcher $\Delta$ N1C2, SpyTag002/SpyCatcher002, SpyTag003/SpyCatcher003, SdyTag/SdyCatcher, DogTag/DogCatcher, SnoopTag/SnoopCatcher y SilkTag/SilkCatcher.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores, caracterizado porque la etiqueta peptídica comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores, caracterizado porque el compañero de unión al péptido incluye la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores, caracterizado porque

cada inmunógeno de la pluralidad de inmunógenos incluye una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consta de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, y variantes de esta.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores, caracterizado porque cada subunidad polipeptídica de la pluralidad de subunidades polipeptídicas incluye una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consta de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y variantes de esta.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores, caracterizado porque cada inmunógeno que incluye una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consta de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, y variantes de esta, se conjuga con cada subunidad polipeptídica que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, al menos 95% o 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 a través de un enlace isopéptido.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores, caracterizado porque cada inmunógeno incluye una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consta de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, y variantes de esta, se conjuga con cada subunidad polipeptídica que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, al menos 95% o 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 a través de un enlace isopéptido.

El Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores, caracterizado porque cada inmunógeno incluye una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consta de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, y variantes de esta, se conjuga con cada subunidad polipeptídica que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%, al menos 95% o 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8 a través de un enlace isopéptido.

Un método para producir el Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores que incluye las etapas de: expresar la pluralidad de inmunógenos de cualquiera de las modalidades en un sistema de expresión procariota o eucariota, expresar independientemente la pluralidad de subunidades polipeptídicas en un sistema de expresión procariota o eucariota, conjugar dicha pluralidad de subunidades polipeptídicas con dicha pluralidad de inmunógenos a través de un enlace isopéptido; y permitir que dicha pluralidad de subunidades polipeptídicas conjugadas con dicha pluralidad de inmunógenos se autoensamblen en el andamiaje proteico multimérico autoensamblante para mostrar dicha pluralidad de inmunógenos en la superficie externa de dicho Bm86Dock-NP inmunogénico.

El método de la modalidad anterior, caracterizado porque la conjugación de dicha pluralidad de subunidades polipeptídicas con dicha pluralidad de inmunógenos se realiza en proporciones entre 1:0,5 y 1:3. Por ejemplo, la relación puede ser 1:0,5, 1:1, 1:1,5, 1:2 o 1:3.

En la presente se proporciona una composición inmunogénica que incluye al menos un inmunógeno

Bm86Dock de cualquiera de las modalidades anteriores o al menos un Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores o al menos un Bm86Dock-NP inmunogénico producido de acuerdo con el método de cualquiera de las modalidades anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable y/o al menos un adyuvante.

La composición inmunogénica de las modalidades anteriores, caracterizada porque el al menos un adyuvante se selecciona de adyuvantes que contienen aluminio, adyuvantes basados en liposomas, gama de adyuvantes Emulsigen, el gel Montanide, Montanide ISA O/W y la gama de adyuvantes Montanide, adyuvante completo e incompleto de Freund, emulsiones de agua en aceite y emulsiones de aceite en agua tales como MF59.

La composición inmunogénica de las modalidades anteriores, en donde el adyuvante que contiene aluminio es hidrogel a base de oxihidróxido de aluminio (AlOH).

Además, en la presente se describe el uso de la composición inmunogénica de cualquiera de las modalidades anteriores como un medicamento, preferentemente como una vacuna.

La composición inmunogénica de cualquiera de las modalidades anteriores es para usar en el tratamiento o la prevención de una infestación por garrapatas y la transmisión de un patógeno transmitido por garrapatas en un sujeto.

La composición inmunitaria de las modalidades anteriores se caracteriza porque la enfermedad transmitida por garrapatas se selecciona del grupo que incluye Babesiosis, Anaplasmosis, Citauxzoonosis, Ehrlichiosis, enfermedad de Lyme, enfermedad de erupción cutánea asociada a garrapatas del sur, rickettsiosis, fiebre recidivante transmitida por garrapatas, enfermedad de *Borrelia mayonii*, tifus, tularemia, encefalitis transmitida por garrapatas, enfermedad por el virus Powassan, fiebre por garrapatas de Colorado, virus Heartland, virus Bourbon, enfermedad forestal de Kyasanur, fiebre hemorrágica de Omsk, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, enfermedad febril grave, parálisis por garrapatas y síndrome alfa-gal.

En la presente se proporciona un método para tratar o prevenir una infestación por garrapatas y la transmisión de un patógeno transmitido por garrapatas en un sujeto, que incluye administrarle una cantidad eficaz de la composición inmunogénica de cualquiera de las modalidades anteriores.

El método de la modalidad anterior se caracteriza porque la composición inmunogénica se administra por vía intramuscular, subcutánea u oral.

El método de cualquiera de las modalidades anteriores, se caracteriza porque la composición inmunogénica se administra como una serie de sensibilización de al menos 2 dosis con aproximadamente 3 a 4 semanas de diferencia seguida de una serie de refuerzo de entre 1 a 4 dosis cada una administrada con 4 meses, 6 meses a 1 año de diferencia.

El método de cualquiera de las modalidades anteriores se caracteriza porque el sujeto es un mamífero doméstico, un ganado o un ave.

En la presente se proporciona una formulación de vacuna que comprende de 5 a 200  $\mu\text{g}$  de Bm86Dock-NP de cualquiera de las modalidades anteriores o Bm86Dock de cualquiera de las modalidades anteriores, y 15 % V/V de Montanide Gel 01 PR en amortiguador de almacenamiento o Tris.

En la presente se proporciona una formulación de vacuna que comprende de 5 a 200  $\mu\text{g}$  del inmunógeno Bm86Dock de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o el Bm86Dock-NP inmunogénico de cualquiera de las modalidades anteriores y un hidrogel a base de oxihidróxido de aluminio (AlOH) en amortiguador de almacenamiento o Tris.

Además, en la presente se proporciona un método para tratar o prevenir infestaciones de garrapatas en mamíferos o aves que incluye la administración intramuscular de una vacuna que comprende un módulo Bm86Dock que tiene la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consta de las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, y variantes como una serie principal con aproximadamente 3 a 4 semanas de diferencia, seguida de una serie de refuerzo con aproximadamente 4, 6 meses a 1 año de diferencia.

## DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

**Las Figuras 1A-E** son representaciones de Bm86 y el módulo Bm86Dock. **A.** Esquema que muestra la arquitectura molecular de la proteína Bm86 derivada de *R. microplus*. **B.** Representación de dibujos animados de la estructura 3D predicha de Bm86 (código Uniprot P20736) que muestra Bm86Dock en negro. **C.** Calidad de predicción de la estructura de Bm86Dock coloreada de acuerdo con la puntuación AlphaFold2 (pLDDT). **D.** Alineación estructural de Bm86Dock (dibujo animado sólido negro) contra un dominio SEA (dibujo animado transparente blanco). **E.** Topología del módulo Bm86Dock. Las hojas beta se nombran de la A a la G, mientras que las hélices alfa se numeran como 1 y 2. Los elementos estructurales se colorean de acuerdo con la superficie expuesta correspondiente. Los enlaces disulfuro se indican con líneas discontinuas, los sitios de glicosilación se señalan con colas de flecha, los residuos involucrados se resaltan en negrita. Se indican los terminales N y C.

**Las Figuras 2A-2C** muestran la variación filogenética del módulo Bm86Dock. **A.** Conservación de la identidad de secuencia entre todas las variantes no redundantes disponibles de *Bm86Dock* de *R. microplus* en GenBank reunidas en todo el mundo y la secuencia de referencia de Australia (secuencia #47, acceso a GenBank M29321 [Rand et al., Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*., Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 9657–9661 (1989)]). Se indica cada identidad de secuencia global y por residuo. Los residuos conservados son de color negro, mientras que los residuos no iguales son de color blanco. Los motivos topológicos identificados en la estructura se mapean en la secuencia en la parte inferior. L1 es el bucle entre  $\beta 1$  y  $\alpha 1$ . Los motivos se agrupan de acuerdo con la superficie inmunogénica mostrada en la proteína. **B.** Mapeo de la identidad de secuencia media por residuo en la estructura 3D de Bm86Dock. Los residuos menos conservados se

etiquetan y representan mediante barras en la escala de color correspondiente. **C.** Árbol filogenético de Bm86Dock de acuerdo con la identidad de secuencia y que comprende homólogos de proteínas tanto de tipo Bm86 como de tipo ATAQ. La alineación de secuencias múltiples se basa en un ajuste estructural por el algoritmo de STAMP. Las estructuras para cada secuencia se recuperaron de la base de datos Alphafold2. Se muestra la similitud estructural entre las proteínas tipo Bm86 o tipo ATAQ. **Las Figuras 3A-3C** muestran la expresión y purificación de Bm86Dock a partir de *E. coli* y células de mamífero. **A.** Gel SDS PAGE que muestra la expresión periplasmática y citoplasmática de Bm86Dock en *E. coli*. **B.** Gel SDS-PAGE que muestra la tubería de purificación completa de Trx-Bm86Dock y cromatografía de exclusión por tamaño. **C.** Expresión y purificación de Bm86Dock en células de mamífero.

**Las Figuras 4A-4C** muestran la caracterización de los enlaces disulfuro predichos de Bm86Dock expresados en *E. coli*. **A.** Representación esquemática de la secuencia Bm86Dock con las cisteínas en negrita y los dos enlaces disulfuro indicados con líneas (SEQ ID NO: 12-13). Se espera que los enlaces disulfuro sean intrapéptidos o interpéptidos de acuerdo con la digestión enzimática. Los dos primeros residuos de la secuencia en gris (glicina y serina) permanecieron después de la escisión de TEV. **B.** La cobertura de secuencia observada mediante análisis espectral de masas se indica mediante los aminoácidos subrayados (SEQ ID NO: 14-16). La presencia de los enlaces disulfuro intrapeptídicos e interpeptídicos esperados se indica en el espectro. Ambos enlaces disulfuro se confirmaron mediante fragmentación peptídica. **C.** Identificación del enlace disulfuro interpeptídico mediante fragmentación peptídica. Se obtuvieron varios fragmentos de la masa esperada para un péptido que contiene el enlace disulfuro y se indican en el espectro (SEQ ID NO: 17-19).

**Las Figuras 5A-5C** muestran una representación esquemática de la nanopartícula inmunogénica Bm86Dock (Bm86Dock-NP).

**Figura 6.** muestra el acoplamiento covalente de Bm86Dock o Bm86Dock002 a una nanopartícula de proteína (NP) mediante métodos de ligación in vitro.

**Las Figuras 7A-7C** muestran la caracterización estructural y biofísica de Bm86Dock y Bm86Dock002. **A.** Espectros de dicroísmo circular de Bm86Dock y Bm86Dock002 en agua. **B.** Espectros de dicroísmo circular de Bm86Dock en agua añadiendo concentraciones crecientes de urea. **C.** Curvas de despliegue térmico de Bm86Dock y Bm86Dock002 medidas por nanoDSF.

**La Figura 8** muestra un gráfico que compara los títulos de IgG después de la inmunización con Bm86Dock y Bm86Dock002.

**La Figura 9** muestra una gráfica que compara los títulos de IgG después de la inmunización con la vacuna Bm86Dock-NP formulada con diferentes adyuvantes.

**La Figura 10** proporciona gráficos que demuestran la inmunogenicidad de Bm86Dock o Bm86Dock-NP en animales bovinos.

**Las Figuras 11A-11D** muestran la prueba de eficacia de campo que evalúa la inmunización con la vacuna Bm86Dock-NP. **A.** Esquema del diseño experimental. **B.** Título de anticuerpos IgG en animales inmunizados con Bm86Dock-NP. **C.** Título de anticuerpos IgG en animales de control. **D.** Parámetros de eficacia medidos en animales de control y vacunados (grupo y selección).

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

Algunas modalidades de la presente invención se analizan en detalle a continuación. En la descripción de modalidades, se emplea terminología específica en aras de la claridad. Sin embargo, no se pretende que la invención se limite a la terminología específica así seleccionada. Un experto en la técnica relevante reconocerá que pueden usarse otros componentes equivalentes y desarrollarse otros métodos sin apartarse de los conceptos amplios de la presente invención. Todas las referencias citadas en cualquier parte de la presente memoria descriptiva, incluidas las secciones de Antecedentes y Descripción Detallada, se incorporan mediante referencia como si cada una se hubiera incorporado individualmente.

En la presente se incluyen algunas definiciones con el fin de comprender la presente materia y las reivindicaciones adjuntas. Las abreviaturas utilizadas en la presente tienen sus significados convencionales dentro de la técnica química y biológica.

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica. *Ver, por ejemplo*, Singleton et al., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY* 2° ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994); Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). Cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento puede usarse en la práctica de esta invención. Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de ciertos términos que se usan con frecuencia en la presente y no pretenden limitar el alcance de la presente descripción.

La presente descripción identifica determinadas secuencias de aminoácidos (péptidos o polipéptidos) como parte de la invención. Debe entenderse que las secuencias identificadas específicamente describen adecuadamente otras secuencias que contienen menos del 100 % de identidad de secuencia con las secuencias identificadas mientras proporcionan la misma función y/o una estructura 3D similar. Por ejemplo, un polipéptido puede contener menos del 100 % de identidad de secuencia con un polipéptido identificado específicamente en la presente mientras proporciona la misma función y una estructura 3D similar a la del polipéptido en su conformación natural. Por ejemplo, un polipéptido puede tener 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, identidad de secuencia o 99 % de identidad de secuencia con un polipéptido específicamente descrito en la presente y aún conservar la misma o suficientemente similar actividad, funcionalidad y/o estructura 3D que el polipéptido

inmunogénico específicamente identificado.

Tal como se usa en la presente, el término «variantes» se refiere a variantes de polipéptido Bm86Dock modificadas estables, cuyos ejemplos se describen en la presente. Las variantes se pueden generar con la ayuda de un método computacional basado en la estructura. El objetivo es alterar la secuencia nativa mientras se conservan y/o mejoran las propiedades deseables (por ejemplo, plegado, estabilidad). En dichas variantes, las sustituciones de aminoácidos que conducen a sustituciones o cambios conservadores en los residuos centrales pueden introducirse en la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5. Los residuos centrales se pueden definir como aminoácidos que no son residuos de superficie. Los residuos de superficie se pueden definir como residuos que pueden formar epítomos y/o pueden estar involucrados en interacciones con otras proteínas. Las mutaciones se pueden introducir mediante técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. En algunas modalidades, las variantes de Bm86Dock pueden tener secuencias de aminoácidos que tienen al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, la variante Bm86Dock002 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 6 tiene un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5, respectivamente. La variante Bm86Dock002 porta 5 mutaciones en residuos centrales fuera de la SEQ ID NO: 1, exhibe una estabilidad térmica mejorada al tiempo que conserva la estructura 3D de Bm86Dock nativo .

Tal como se usa en la presente, el término «epítomo» se refiere a un determinante antigénico, una parte del módulo Bm86Dock que es reconocido por el sistema inmunitario en el contexto de la invención, específicamente por anticuerpos, linfocitos B o linfocitos T. Un epítomo puede ser un epítomo de linfocitos B o un epítomo de linfocitos T. Un epítomo de células B es una secuencia peptídica que se requiere para el reconocimiento por células B productoras de anticuerpos específicos. Por ejemplo, un epítomo de linfocitos B se refiere a una región específica de Bm86Dock que es reconocida por un anticuerpo. Un epítomo puede ser un epítomo conformacional o un epítomo lineal. Un epítomo lineal o continuo se define por la secuencia de aminoácidos primaria de una región particular de un Bm86Dock. Un epítomo conformacional se define por la estructura conformacional del Bm86Dock nativo. Un epítomo conformacional puede ser continuo o discontinuo, es decir, los componentes del epítomo pueden estar situados en partes dispares del Bm86Dock, que se acercan entre sí en la estructura nativa plegada.

Tal como se usa en la presente, el término «fragmento» se refiere a un péptido o polipéptido de polímero de tipo cadena formado por al menos 6 residuos de aminoácidos que están unidos entre sí a través de enlaces peptídicos. Puede incluir secuencias de aminoácidos que son variaciones conservativas. Los términos fragmento, péptido y polipéptido se utilizan indistintamente. En el contexto de la invención, un fragmento inmunogénico puede tener uno o más epítomos lineales y/o

conformacionales que pueden inducir una respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células. Por ejemplo, un fragmento inmunogénico de Bm86Dock puede ser el péptido de la SEQ ID NO: 1. Se entiende que Bm86Dock puede comprender más de un fragmento inmunogénico y puede mostrar epítomos adicionales.

Tal como se usa en la presente, el término «anticuerpo» se refiere a una proteína producida por las células B del sistema inmunitario que puede identificar, unirse y neutralizar un antígeno, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 del módulo Bm86Dock. El anticuerpo puede tener propiedades neutralizantes y puede ser capaz de conferir inmunidad protectora contra las garrapatas y la transmisión de patógenos transmitidos por garrapatas.

Tal como se usa en la presente, el término «dominio» se refiere a cualquier región en una proteína que muestra una característica funcional o rasgo estructural particular.

Tal como se usa en la presente, el término «módulo» se refiere a un dominio o subdominio de una proteína natural que se puede plegar de forma independiente mientras conserva su estructura 3D natural. Es decir, la misma estructura 3D o suficientemente similar a la estructura 3D del polipéptido dentro de la proteína de longitud completa nativa.

Tal como se usa en la presente, el término «nativo» se refiere a la estructura 3D de una proteína o módulo en su estado biológicamente activo natural. La estructura está determinada por la secuencia de aminoácidos de la proteína o módulo, así como por cualquier modificación postraduccional. Un módulo nativo puede llevar a cabo su función designada independientemente de la proteína nativa de la que se deriva.

Tal como se usa en la presente, el término «enlace isopeptídico» se refiere a un enlace amida entre un grupo amino de un aminoácido y un grupo carboxilo de otro aminoácido en el que al menos uno de estos grupos no está unido al carbono  $\alpha$ . Los enlaces isopeptídicos más comunes se forman entre el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina en una proteína y un grupo carboxilo en una segunda proteína. Una «etiqueta peptídica» es un péptido que forma un enlace isopeptídico covalente espontáneo, tras la unión con su «compañero de unión peptídica». Una «proteína isopeptídica» se refiere a una etiqueta peptídica acoplada/pareja de unión peptídica capaz de formar espontáneamente un enlace isopeptídico.

Varias de las vacunas recombinantes más eficaces contra garrapatas contienen o se basan en la proteína Bm86. En particular, la proteína de longitud completa recombinante Bm86 (WO1988003929A1) y los homólogos relacionados Bm95, Bm86TX (US20180085443A1), Bm86Uy (BR102015017673B1) se han utilizado solos, en cócteles como Bm86 + pP0 (EP2623114B1), Bm86Uy + Bm05 (BR102015017673B1), Bm86 + Subolesina (WO2014154847A1) o como fusiones quiméricas Bm95-MSP1a (US8435537B2), Bm86-pP0 (EP2623114B1) para producir vacunas de garrapatas subunitarias. Varios péptidos quiméricos

generados a partir de secuencias pequeñas no consecutivas (<20 aminoácidos) de Bm86 también están patentados, tales como SBm4912 y SBm7462 (EP1289545B1), y el tándem SBm7462 (WO2015054764A1).

El desarrollo de vacunas recombinantes contra garrapatas basadas en Bm86 se ha visto obstaculizado por los desafíos de producción y la retención de la eficacia. La efectividad de los sistemas de expresión basados en bacterias de bajo costo está limitada por la longitud de la proteína a producir y la presencia de parches hidrófobos, así como enlaces disulfuro que conducen a agregados de antígenos. Los agregados de antígeno de mala calidad pueden requerir la resolubilización de los cuerpos de inclusión, lo que agrega pasos al proceso de fabricación. Además, las vacunas quiméricas anteriores muestran diversos grados de efectividad que van desde ~50 % a ~90 %. debido a la variabilidad genética dentro de las poblaciones y dentro de las especies. Las diferencias tan bajas como 3 % en la identidad de secuencia pueden ser suficientes para disminuir la eficacia de la vacuna a niveles inaceptables (por ejemplo, respuesta inmune protectora débil). Estas características estructurales también pueden evitar que la secuencia de longitud completa se acople a las tecnologías de visualización de nanopartículas. Como resultado, solo se comercializan dos vacunas basadas en la proteína Bm86: TickGARD® y Gavac®. Algunos dominios derivados de Bm86, como los dominios similares a EGF predichos por secuencia de las regiones N y C-terminales de *Ixodes scapularis*, se evaluaron como candidatos a vacuna, pero no provocaron inmunidad duradera o potente. Las secuencias similares a EGF codifican dominios en lugar de módulos porque se expresaron como cuerpos de inclusión que requieren urea para solubilizarlos como polipéptidos desnaturalizados. La presente descripción identifica proteínas quiméricas, composiciones y vacunas que superan los desafíos de la técnica, y métodos que permiten la producción de vacunas que se pueden variar de una manera que mantenga la seguridad, estabilidad y eficacia.

Como se identifica en el presente documento, una forma eficaz de abordar la eficacia limitada de la vacuna Bm86 es el uso de nanopartículas basadas en proteínas multiméricas autoensamblables que pueden mostrar múltiples copias de inmunógenos derivados de Bm86. En algunos aspectos de las modalidades, el diseño racional de módulos Bm86Dock recombinantes que muestran epítomos derivados de Bm86 de la proteína Bm86 de *R. microplus* da como resultado inmunógenos potentes capaces de inducir una respuesta inmunitaria protectora y pueden ser activos en un amplio espectro de especies de garrapatas.

También se mejoran los métodos para producir las vacunas contra garrapatas en células de *E. coli* o de mamífero, produciendo vacunas solubles y homogéneas de una manera rentable, al tiempo que se reduce la variabilidad de lote a lote.

### **Módulo Bm86Dock**

Bm86Dock es un módulo de plegamiento funcional recientemente descubierto que nunca se ha

utilizado antes de la presente invención como inmunógeno en formulaciones de vacunas contra garrapatas. Bm86 es una glicoproteína multidominio de aproximadamente 650 residuos, que está presente en el intestino medio de las garrapatas [Rand et al., Clonación y expresión de un antígeno protector de la garrapata bovina *Boophilus microplus*, Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 9657–9661 (1989)]. Bm86 ha demostrado inmunogenicidad y un papel en la transmisión de patógenos bacterianos de garrapatas infectadas a los huéspedes [Pereira et al., *Rhipicephalus microplus*: Una descripción general de los antígenos de la vacuna contra la garrapata del ganado, Ticks Tick-Borne Dis. 13, 101828 (2022); Koči et al., Antibodies against EGF-like domains in *Ixodes scapularis* Bm86 orthologs impact tick feeding and survival of *Borrelia burgdorferi*, Sci. Rep. 11, 6095 (2021)]. Las proteínas homólogas estrechamente relacionadas llamadas ATAQ también están presentes en las garrapatas; sin embargo, su patrón de expresión difiere en la localización tisular y la etapa de desarrollo [Nijhof et al., Bm86 homologues and novel ATAQ proteins with multiple epidermal growth factor (EGF)-like domains from hard and soft ticks, Int. J. Parasitol. 40, 1587–1597 (2010)]. La arquitectura molecular de la familia de proteínas Bm86 se ha predicho a través de la homología de secuencia con dominios funcionales conocidos, ya que aún no está disponible una estructura validada experimentalmente (**Figura 1A**). La estructura general contiene un péptido señal N-terminal de 20 residuos de longitud, seguido de un tándem de siete dominios variables similares a EGF que abarcan hasta aproximadamente 350 residuos de la secuencia de longitud completa. Los dominios de anclaje, transmembrana o similares a EGF de glicosil-fosfatidilinositol se encuentran desde el residuo aproximadamente 480 hasta el final de la secuencia. Hasta la fecha, no se han descrito otros dominios estructurales, ni se han informado en la base de datos Pfam [Mistry et al., Pfam: La base de datos de familias de proteínas en 2021, Nucleic Acids Res. 49, D412–D419 (2021)].

En algunas modalidades, un módulo Bm86Dock (también denominado en la presente simplemente Bm86Dock o Bm86Dock recombinante o las variantes descritas en la presente) se deriva de Bm86 de longitud completa que se identificó en función de la estructura 3D predicha de Bm86 recuperada de la base de datos AlphaFold2 [Varadi et al., AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models, Nucleic Acids Res. 50, D439–D444 (2022)] (**Figura 1B**). El nuevo módulo Bm86Dock se identificó y seleccionó en función de las características estructurales, bioquímicas, biológicas e inmunológicas predichas para optimizar la expresión de proteínas y su inmunogenicidad potencial para formulaciones de vacunas. El nuevo módulo plegable no caracterizado Bm86Dock incluye una de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2. (**Figura 1B**) Estructuralmente, Bm86Dock es un módulo proteico globular pequeño (<20 kDa) que tiene una puntuación de predicción de alta calidad (**Figura 1C**), pocos parches hidrófobos y solo dos enlaces disulfuro predichos. Por el contrario, la proteína Bm86 de longitud completa es de 89 kDa y tiene 65 cisteínas. Además, Bm86Dock tiene 2 sitios de

glicosilación putativos en la asparagina 348 y 382, lo que puede aumentar su solubilidad e inmunogenicidad. En particular, Bm86Dock no tiene más del 30 % de identidad de secuencia con proteínas huésped o proteínas no garrapatas (NCBI Blast), lo que reduce el riesgo de reactividad cruzada de anticuerpos. Para caracterizar aún más el módulo Bm86Dock, se realizó una búsqueda de homólogos estructurales con Dalí contra el Protein Data Bank (PDB) [Holm, Dali server: structural unification of protein families, Nucleic Acids Res. 50, W210–W215 (2022); Berman et al., The Protein Data Bank, Nucleic Acids Res. 28, 235–242 (2000)]. El dominio SEA se identificó como el dominio estructuralmente más relevante con un porcentaje de identidad del 11 % (puntaje Z de 7,2 frente a PDB id. 1IVZ, **Figura 1D**). Bm86Dock es un nuevo módulo de plegado funcional y su topología muestra una disposición no trivial de motivos de hélice alfa y lámina beta que definen 4 superficies expuestas al disolvente (**Figura 1E**).

El análisis filogenético de las variantes de Bm86Dock de *R. microplus* disponible en GenBank muestra una alta conservación de la identidad de la secuencia global y por residuo (**Figura 2A**). De hecho, la mayoría de las superficies expuestas se conservaron, mientras que solo unos pocos residuos cambiaron en la población promedio. (**Figura 2B**) Los residuos menos conservados en Bm86Dock se ubicaron al comienzo de la hélice alfa 1 y 2. (**Figuras 2A-2B**) De estos 5 residuos, la fenilalanina 351 no estuvo expuesta al solvente de acuerdo con el modelo 3D y puede no estar involucrada con un epítipo inmunogénico. Un análisis adicional mostró que Bm86Dock tiene altas homologías de secuencia y conservación de la estructura entre diferentes especies de garrapatas. (**Figura 2C**) De hecho, Bm86Dock fue una huella digital para proteínas similares a Bm86 y similares a ATAQ, pudiendo reproducir con precisión el árbol filogenético de la secuencia de longitud completa.

En el contexto de la invención, Bm86Dock es un pequeño módulo soluble bien plegado, lo que lo hace adecuado para la expresión como un polipéptido individual o fusionado, así como para el acoplamiento covalente con otras proteínas mediante diversos sistemas de ligación in vitro.

En algunas modalidades, el módulo Bm86Dock y sus variantes llevan al menos un fragmento inmunogénico de 14 aminoácidos como se define en la SEQ ID NO: 1, ubicado en la hélice alfa 2. El fragmento inmunogénico se incluyó previamente en las vacunas de péptidos quiméricos SBm4912 y SBm7462 [Patarroyo et al., Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86), Vet. Immunol. Immunopathol. 88, 163–172 (2002)]. Dentro del módulo Bm86Dock, SEQ ID NO: 1 se muestra en su contexto estructural nativo, lo que permite tanto su reconocimiento por las células T como por los anticuerpos producidos por las células B, una característica que apenas cumplen las vacunas peptídicas.

En algunas modalidades, el módulo Bm86Dock y sus variantes, incluyendo el módulo Bm86Dock002 descrito en la presente muestran regiones conservadas adicionales con epítopos lineales y/o conformacionales potenciales, lo que lo hace menos susceptible a pequeñas variaciones de secuencia

y reduce el riesgo de escape mutacional. En particular, el módulo Bm86Dock y sus variantes no tienen homólogos de huésped, lo que permite la producción de vacunas de amplio espectro contra diferentes especies de garrapatas al tiempo que otorga especificidad y seguridad. Cabe señalar que otros dominios de Bm86 fuera de Bm86Dock se probaron para determinar su inmunogenicidad sin mostrar una alta potencia [Koči et al., Antibodies against EGF-like domains in Ixodes scapularis Bm86 orthologs impact tick feeding and survival of *Borrelia burgdorferi*, Sci. Rep. 11, 6095 (2021)].

En otros aspectos de las modalidades, se pueden introducir una o más sustituciones de aminoácidos que conducen a sustituciones y/o cambios conservadores en los residuos centrales en la secuencia del módulo Bm86Dock. Estructuralmente, las variantes de Bm86Dock pueden mejorar la estabilidad térmica al tiempo que adoptan una estructura 3D similar a la de Bm86Dock nativo. Funcionalmente, las variantes de Bm86Dock pueden inducir una respuesta inmunitaria más fuerte mientras conservan los mismos residuos de superficie involucrados en epítomos lineales y/o conformacionales de Bm86Dock nativo. Una modalidad de ejemplo de una variante de Bm86Dock se describe en la presente como Bm86Dock002 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3. Bm86Dock002 ha mejorado la estabilidad térmica (**Figura 7C**) y la inmunogenicidad (**Figura 8**) en comparación con Bm86Dock, al tiempo que conserva la estructura 3D de Bm86Dock nativo (es decir, se conservan los epítomos conformacionales) (**Figura 7A**). Bm86Dock002 tiene un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de Bm86Dock nativo y difiere en 5 sustituciones de residuos centrales (es decir, residuos no expuestos y no inmunogénicos). Las sustituciones están fuera del fragmento inmunogénico (SEQ ID NO: 1) y no están presentes solos o en ninguna combinación en ninguna variante natural conocida de *R. microplus* presentada en la **Figura 2A**. Bm86Dock002 exhibe la misma versatilidad que Bm86Dock y puede fusionarse a una etiqueta peptídica o un compañero de unión peptídico (**Figura 6**)

Se pueden construir variantes de Bm86Dock adicionales de una manera similar a Bm86Dock002. Las variantes de Bm86Dock no portan mutaciones en residuos superficiales que puedan formar epítomos conformacionales y/o lineales. Las mutaciones se limitan a los residuos centrales del Bm86Dock; dichas mutaciones mejoran la estabilidad térmica de las variantes sin alterar la estructura 3D, lo que permite la presentación de epítomos. Por ejemplo, se pueden generar variantes para proporcionar sustituciones similares a las ejemplificadas en la SEQ ID NO: 3. Se evita la mutación de residuos de superficie que pueden formar epítomos conformacionales y/o lineales. Sin embargo, las sustituciones en la SEQ ID NO: 3 puede modificarse seleccionando residuos centrales diferentes o adicionales proximales a los cambiados en la SEQ ID NO: 3 y sustituyendo otros aminoácidos que no alteran la estructura 3D, es decir, mantienen la presentación de epítomos.

Bm86Dock y las variantes como se describe en la presente son inmunógenos potentes. La estructura 3D de Bm86Dock y sus variantes facilitan la presentación de múltiples epítomos conformacionales

y/o lineales altamente inmunogénicos, que provocan la producción de un repertorio de anticuerpos de alta calidad. Esto es una ventaja frente a vacunas de longitud completa o peptídicas, tales como Bm86 (WO1988003929A1), Bm86Uy (BR102015017673B1), SBm4912 y SBm7462 (EP1289545B1) y SBm7462 en tándem (WO2015054764A1).

Bm86Dock y las variantes descritas en la presente son seguras. Debido a que están ausentes del proteoma de mamífero, las respuestas autoinmunes o la tolerancia al antígeno se pueden prevenir en mamíferos inmunizados. Por el contrario, las vacunas que contienen la proteína Bm86 de longitud completa con dominios EGF, para los cuales se expresan homólogos en mamíferos, dan como resultado una seguridad reducida.

Bm86Dock y las variantes descritas en la presente proporcionan una amplia protección. Las secuencias y estructuras de Bm86Dock se conservan en gran medida entre diferentes especies de garrapatas. Por el contrario, la eficacia de las vacunas de proteína de longitud completa, como la vacuna Bm86 descrita en WO1988003929A1 y la vacuna Bm86Uy descrita en BR102015017673B1, depende del parásito circulante debido a las respuestas inmunitarias hacia las regiones inmunodominantes variables. De manera similar, la presencia de varias regiones inmunogénicas conservadas en Bm86Dock lo hace menos susceptible a pequeñas variaciones de secuencia que las vacunas peptídicas, incluidas SBm4912 y SBm7462 descritas en EP1289545B1, y SBm7462 en tándem descrito en WO2015054764A1.

Bm86Dock y las variantes descritas en la presente son modulares y adaptables. El tamaño, la solubilidad y la capacidad de fusionar proteínas adaptadoras permiten una amplia gama de aplicaciones. La versatilidad del módulo inmunogénico es otra ventaja más sobre la proteína Bm86 de longitud completa.

La producción de Bm86Dock y las variantes descritas en la presente es rentable. Bm86Dock y sus variantes se pueden producir en diferentes sistemas de expresión, incluso en *E. coli* y células de mamíferos, produciendo proteínas de alta calidad. (Figuras 3A-3C) Los métodos de las modalidades son escalables, lo que reduce los costos y facilita la transferencia de tecnología. Esa es una ventaja significativa en comparación con las vacunas de péptidos sintéticos tales como SBm4912 y SBm7462.

#### ***Nanopartículas inmunogénicas Bm86Dock (Bm86Dock-NP)***

La eficacia de una vacuna puede depender de varios factores incluyendo el diseño estructural del inmunógeno, la suplementación con adyuvantes y potencialmente el régimen de dosificación de inmunización. El diseño estructural del módulo inmunogénico Bm86Dock es especialmente crítico para mejorar la respuesta humoral dado que los linfocitos B reconocen los antígenos en función de su forma y densidad en la superficie de un patógeno. La visualización de múltiples copias del módulo Bm86Dock recombinante o sus variantes en una estructura multivalente imita la estructura del

patógeno que potencialmente aumenta la activación de células B específicas de antígeno a través de la reticulación del receptor, lo que lleva a la producción de anticuerpos neutralizantes. (**Figuras 8-11**)

En algunas modalidades, Bm86Dock-NP incluye un andamiaje de proteína multimérica autoensamblable compuesto por una pluralidad de subunidades polipeptídicas y una pluralidad de inmunógenos, en donde cada inmunógeno se conjuga con una subunidad polipeptídica de la pluralidad de subunidades polipeptídicas y donde cada inmunógeno de la pluralidad de inmunógenos comprende un módulo recombinante (Bm86Dock) de una proteína Bm86 que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3. El Bm86Dock-NP provoca una respuesta inmunitaria en el sujeto. En particular, la pluralidad de Bm86Dock recombinante se muestra en la superficie externa del andamiaje de proteína multimérica autoensamblable. (**Figuras 5A-5C**) Por ejemplo, el armazón de proteína multimérica de autoensamblaje puede estar compuesto de al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 20, al menos 24, al menos 36, al menos 48, al menos 60, al menos 120, al menos 180, al menos 240 subunidades de polipéptido. Preferentemente, los armazones de proteínas multiméricas de autoensamblaje derivan de ferritina o lumazina sintasa (LS) y están compuestos por 24 subunidades polipeptídicas o 60 subunidades polipeptídicas.

En algunos aspectos de las modalidades, el andamiaje de proteína multimérico autoensamblable puede tener una simetría icosaédrica, una simetría dodecaédrica, una forma anular o una forma cilíndrica.

En algunos aspectos de las modalidades, Bm86Dock-NP muestra al menos un epítipo lineal y/o al menos un epítipo conformacional del módulo Bm86Dock nativo. Un epítipo lineal puede consistir en residuos continuos dentro de la secuencia de aminoácidos del módulo Bm86Dock. Por otro lado, un epítipo conformacional consiste en residuos que son discontinuos en la secuencia Bm86Dock pero se acercan entre sí para formar una superficie antigénica/inmunogénica en el módulo Bm86Dock plegado. Preferentemente, se muestra un epítipo conformacional en la configuración 3D nativa de Bm86Dock. El reconocimiento de epítopos en Bm86Dock-NP conduce a la estimulación y activación de células B/células T y la posterior producción de anticuerpos protectores o neutralizantes. Se entiende que las variantes de Bm86Dock no portan mutaciones en residuos de superficie que pueden formar epítopos conformacionales y/o lineales. Las mutaciones se limitan a los residuos centrales del Bm86Dock como se ejemplifica en la SEQ ID NO: 3; dichas mutaciones mejoran la estabilidad térmica de las variantes sin alterar la estructura 3D permitiendo la visualización de epítopos.

Los ejemplos no taxativos de proteínas multiméricas autoensamblantes son nanopartículas de lumazina sintasa (LS) [Ladenstein & Morgunova, Second career of a biosynthetic enzyme: Lumazine synthase as a virus-like nanoparticle in vaccine development, *Biotechnol. Rep.* 27, e00494 (2020)],

nanopartículas de ferritina [Wang et al., Ferritin nanoparticle-based SpyTag/SpyCatcher-enabled click vaccine for tumor immunotherapy, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 16, 69–78 (2019); Georgiev et al., Two-Component Ferritin Nanoparticles for Multimerization of Diverse Trimeric Antigens, *ACS Infect. Dis.* 4, 788–796 (2018)], nanopartículas de E2p [He et al., Proof of concept for rational design of hepatitis C virus E2 core nanoparticle vaccines, *Sci. Adv.* 6, eaaz6225 (2020)], nanopartículas de BP26 [Kang et al., Antigen-Presenting, Self-Assembled Protein Nanobarrels as an Adjuvant-Free Vaccine Platform against Influenza Virus, *ACS Nano* 15, 10722–10732 (2021)], nanopartículas de péptido  $\beta$ -annulus (WO2022043449A1, [Lainšček et al., A Nanoscaffolded Spike-RBD Vaccine Provides Protection against SARS-CoV-2 with Minimal Anti-Scaffold Response, *Vaccines* 9, 431 (2021)]), nanopartículas AP205 [Shishovs et al., Structure of AP205 Coat Protein Reveals Circular Permutation in ssRNA Bacteriophages, *J. Mol. Biol.* 428, 4267–4279 (2016); Brune et al., Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization, *Sci. Rep.* 6, 19234 (2016)], nanopartículas de encapsulina [Kanekiyo et al., Rational Design of an Epstein-Barr Virus Vaccine Targeting the Receptor-Binding Site, *Cell* 162, 1090–1100 (2015)], nanopartícula de sHSP (US20070258889A1, [Flenniken et al., The Small Heat Shock Protein Cage from *Methanococcus jannaschii* Is a Versatile Nanoscale Platform for Genetic and Chemical Modification, *Nano Lett.* 3, 1573–1576 (2003)]), nanopartículas de CCMV (US20070258889A1), nanopartículas de bacteriófago P22 [Patterson et al., Sortase-Mediated Ligation as a Modular Approach for the Covalent Attachment of Proteins to the Exterior of the Bacteriophage P22 Virus-like Particle, *Bioconjug. Chem.* 28, 2114–2124 (2017)] y nanopartículas sintéticas, por ejemplo, I3-01 [Hsia et al., Design of a hyperstable 60-subunit protein icosahedron, *Nature* 535, 136–139 (2016)], I3-01 mutado (mi3, CN111991556A, [Bruun et al., Engineering a Rugged Nanoscaffold To Enhance Plug-and-Display Vaccination, *ACS Nano* 12, 8855–8866 (2018)]), I32-19, I32-58 y I53-50 [Lacasta et al., Design and immunological evaluation of two-component protein nanoparticle vaccines for East Coast fever, *Front. Immunol.* 13, (2023)], u otros [Lutz et al., Top-down design of protein architectures with reinforcement learning, *Science* 380, 266–273 (2023)].

### ***Conjugación mediante enlace isopeptídico***

Una consideración importante en el diseño de Bm86Dock-NP es la conjugación del inmunógeno Bm86Dock con la proteína multimérica de autoensamblaje de modo que no interfiera con el autoensamblaje de la proteína multimérica y bloquee el inmunógeno Bm86Dock en su conformación de preconjugación, por ejemplo, la estructura 3D es suficientemente similar a su estructura 3D en conformación nativa. (**Figuras 5A-5C**)

En algunas modalidades, un inmunógeno de Bm86Dock que incluye un módulo de Bm86Dock recombinante incluye una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consta de la SEQ ID N: 2, SEQ ID NO:3 y variantes de estas conjugadas a través de un enlace isopeptídico a una

subunidad polipeptídica de una pluralidad de subunidades polipeptídicas que se autoensamblaron en una proteína multimérica. En un aspecto de la modalidad, el enlace isozeptídico es un enlace covalentemente no reversible entre un péptido etiqueta y un compañero de unión peptídico.

En algunos aspectos de las modalidades, el péptido etiqueta se fusiona al módulo Bm86Dock, y el compañero de unión peptídico se fusiona a una subunidad polipeptídica del andamiaje proteico multimérico autoensamblable. El péptido etiqueta se puede fusionar al módulo Bm86Dock mediante un enlazador. De manera similar, el compañero de unión al péptido se puede fusionar a una subunidad polipeptídica del andamiaje de proteína multimérica autoensamblante mediante un enlazador.

En otros aspectos de las modalidades, el péptido marcador se fusiona a la subunidad polipeptídica del andamiaje de proteína multimérica de autoensamblaje y el compañero de unión al péptido se fusiona al módulo Bm86Dock. El péptido de etiqueta se puede fusionar a una subunidad polipeptídica del andamiaje de proteína multimérica autoensamblable mediante un enlazador y el compañero de unión al péptido se puede fusionar al módulo Bm86Dock mediante un enlazador.

En algunos aspectos de las modalidades, el enlazador puede ser un enlazador flexible que tiene una secuencia que comprende tramos de residuos de glicina y serina (enlazador GS). Un ejemplo de un enlazador puede tener la secuencia (SGG)<sub>n</sub>, donde n es un número entero que varía de 2 a 10. La longitud del enlazador GS puede optimizarse para lograr una separación adecuada o mantener la interacción entre los péptidos y las proteínas funcionales. En una modalidad preferida, n es igual a 3 y el enlazador tiene la secuencia SGGSGGSGG (SEQ ID NO: 11). El enlazador flexible también puede contener aminoácidos adicionales tales como treonina y alanina para mantener la flexibilidad, así como aminoácidos polares tales como lisina y ácido glutámico para mejorar la solubilidad. En una modalidad preferida, el enlazador puede tener la secuencia SGGGSGSGEGSG (SEQ ID NO: 10). Los ejemplos no limitantes de etiqueta peptídica/socio de unión peptídica son SpyTag/SpyCatcher, SpyCatcherΔN1, SpyCatcherΔN2, SpyCatcherΔN3, SpyCatcherΔN1C1, SpyCatcherΔN1C2, SpyTag002/SpyCatcher002, SpyTag003/SpyCatcher003, SdyTag/SdyCatcher, DogTag/DogCatcher, SnoopTag/SnoopCatcher y SilkTag/SilkCatcher.

En algunas modalidades, la etiqueta peptídica comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4. En un aspecto de la modalidad, la secuencia de aminoácidos del módulo Bm86Dock fusionado al péptido etiqueta tiene un aminoácido que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y variantes de esta.

En otras modalidades, el compañero de unión al péptido comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7. En un aspecto de la modalidad, la secuencia de aminoácidos del compañero de unión al péptido fusionado a la subunidad polipeptídica del armazón de proteína multimérica de autoensamblaje tiene al menos

90 %, al menos 95 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8. En un aspecto de la modalidad, la secuencia de aminoácidos de la subunidad polipeptídica del armazón de proteína multimérica de autoensamblaje tiene al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9.

**Tabla 1. Secuencias**

|               |                         | Descripción                                                                        |
|---------------|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 1  | <i>R. microplus</i>     | Fragmento inmunogénico                                                             |
| SEQ ID NO: 2  | <i>R. microplus</i>     | Módulo Bm86Dock (tipo salvaje)                                                     |
| SEQ ID NO: 3  | Sec. sintética          | Módulo Bm86Dock002                                                                 |
| SEQ ID NO: 4  | Sec. sintética          | Etiqueta péptido, SpyTag003                                                        |
| SEQ ID NO: 5  | Sec. sintética          | Bm86Dock-SpyTag003                                                                 |
| SEQ ID NO: 6  | Sec. sintética          | Bm86Dock002-SpyTag003                                                              |
| SEQ ID NO: 7  | Sec. sintética          | Pareja de unión peptídica, SpyCatcher003                                           |
| SEQ ID NO: 8  | Sec. sintética          | La subunidad del polipéptido LS recombinante se fusiona con SpyCatcher003          |
| SEQ ID NO: 9  | <i>Aquifex Aeolicus</i> | Subunidad polipeptídica LS                                                         |
| SEQ ID NO: 10 | Sec. sintética          | SGGGGSGSGEGSG                                                                      |
| SEQ ID NO: 11 | Sec. sintética          | SGGSGGSGG                                                                          |
| SEQ ID NO: 12 | Sec. sintética          | GSNEYYYTVS FTPNISFDSD HCKWYEDRVL<br>EAIRTSIGKE VFKVEILNCT Q                        |
| SEQ ID NO: 13 | Sec. sintética          | DIKARLIAEK PLSKHVLRKL QACEHPIGEW<br>CMMYPKLLIK KNSATEIEEE N                        |
| SEQ ID NO: 14 | Sec. sintética          | GSNEYYYTVS FTPNISFDSD HCKWYEDRVL<br>EAIRTSIGKE VFKVEILNCT QDIKARLIAK<br>EKPLSKHVLR |
| SEQ ID NO: 15 | Sec. sintética          | KLQACEHPIG EWCMMYPKLL IKKNSATEIE<br>EENSGGGGSG SGEGSGRGVP HIVMDAYKRY K             |

|               |                     |                           |
|---------------|---------------------|---------------------------|
| SEQ ID NO: 16 | <i>R. microplus</i> | LQACEHPIGE WCMMYPK        |
| SEQ ID NO: 17 | Sec. sintética      | GSNEYYYTVS FTPNISFDSD HCK |
| SEQ ID NO: 18 | Sec. sintética      | VEILNCTQDI K              |
| SEQ ID NO: 19 | Sec. sintética      | SDHCK                     |

### ***Métodos para producir Bm86Dock-NP***

En algunas modalidades, un vector de expresión puede modificarse genéticamente para incorporar la secuencia de ácido nucleico que codifica el módulo Bm86Dock recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consta de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y variantes de esta o que codifican la subunidad de la proteína multimérica autoensamblante que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9. Los vectores de expresión pueden seleccionarse de aquellos fácilmente disponibles para uso en sistemas de expresión procariotas o eucariotas. Bm86Dock-NP se puede producir en la fabricación a gran escala a través de sistemas de *E. coli* o eucariotas que pueden incluir, de modo no taxativo, células de mamífero, células de insecto y células de levadura.

En algunas modalidades, el método para producir el Bm86Dock-NP inmunogénico, incluye: expresar la pluralidad de inmunógenos de Bm86Dock que tienen la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consta de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y variantes de este en un sistema de expresión procariota o eucariota, que expresa independientemente la pluralidad de subunidades polipeptídicas que tienen una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 en un sistema de expresión procariota o eucariota, conjugar dicha pluralidad de subunidades polipeptídicas con dicha pluralidad de inmunógenos a través de un enlace isopeptídico; y permitir que dicha pluralidad de subunidades polipeptídicas conjugadas con dicha pluralidad de inmunógenos se autoensamblen en el andamiaje proteico multimérico autoensamblante para mostrar dicha pluralidad de inmunógenos en la superficie externa de dicho Bm86Dock-NP inmunogénico. El armazón proteico multimérico autoensamblable puede comprender 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24, 60, 120, 180 o 240 subunidades polipeptídicas o más.

En otras modalidades, el método para producir el Bm86Dock-NP inmunogénico incluye: expresar la pluralidad de inmunógenos Bm86Dock fusionados directamente a las subunidades polipeptídicas de NP a través de una secuencia enlazadora como una fusión proteica directa, en un sistema de expresión procariota o eucariota; y permitir que dicha pluralidad de subunidades polipeptídicas se autoensamblen en el andamiaje proteico multimérico autoensamblante para mostrar dicha pluralidad de inmunógenos en la superficie externa de dicho Bm86Dock-NP inmunogénico.

### ***Usos terapéuticos y profilácticos***

Tal como se usa en la presente, el término «inmunización» se refiere al proceso de inducción de inmunidad, que incluye, de modo no taxativo, producir anticuerpos contra Bm86Dock. La inmunización se puede inducir a través de la vacunación. La inmunización suele ser de larga duración y puede reactivarse mediante la administración repetida de refuerzos. La inmunización se puede usar terapéuticamente en animales infestados por garrapatas o profilácticamente para controlar la infestación por brotes o evitar que los animales se infesten y desarrollen enfermedades transmitidas por garrapatas.

Tal como se usa en la presente, el término «adyuvante» se refiere a una sustancia que aumenta la intensidad de la respuesta inmunitaria después de la administración conjunta con un inmunógeno. Un adyuvante puede actuar como un inmunopotenciador útil para permitir que la composición inmunogénica o vacuna induzca respuestas inmunitarias potentes y persistentes, al tiempo que reduce la dosis y el número de refuerzos. El adyuvante también puede aumentar la estabilidad de la composición inmunogénica o vacuna. En el contexto de la invención, un adyuvante se selecciona preferentemente de entre adyuvantes que contienen aluminio, una gama de adyuvantes Emulsigen, adyuvantes basados en liposomas, el gel Montanide, Montanide ISA O/W y la gama de adyuvantes Montanide, adyuvante completo e incompleto de Freund, emulsiones de agua en aceite y emulsiones de aceite en agua tales como MF59. En una modalidad preferida, al menos uno de los adyuvantes es Montanide Gel 01 PR. **(Figuras 8-9)**. En otra modalidad preferida, al menos uno de los adyuvantes es una suspensión de hidrogel de oxihidróxido de aluminio tal como Alhydrogel®. **(Figura 9)** Se entiende que el tipo de adyuvante se puede adaptar al tipo de animal que recibe la composición inmunogénica para optimizar la respuesta inmunitaria protectora.

En una modalidad ilustrativa, la vacuna contra garrapatas comprende Bm86Dock002-NP formulado con un hidrogel de oxihidróxido de aluminio (AlOH) tal como Alhydrogel®. **(Figura 9)**. En otra modalidad de ejemplo, la vacuna contra garrapatas comprende Bm86Dock-NP formulado con Montanide Gel 01 PR. **(Figuras 8-11)**. Dichas modalidades ejemplares son capaces de provocar la producción de anticuerpos protectores en sujetos inmunizados.

La presente invención proporciona un diseño eficaz que aborda la eficacia limitada del antígeno de vacuna Bm86 de la técnica anterior mediante el uso de andamiaje de proteína multimérica autoensamblante para mostrar múltiples copias del módulo Bm86Dock recombinante inmunogénico y, como tal, formar un Bm86Dock-NP inmunogénico. La matriz de inmunógenos Bm86Dock de alta densidad y estructuralmente organizada presentada en la superficie externa de la nanopartícula permite múltiples interacciones estimulantes que mejoran la protección inmunitaria contra las garrapatas.

En algunas modalidades, un Bm86Dock-NP combina una pluralidad de módulos de Bm86Dock y

una proteína multimérica de autoensamblaje de modo que los estados conformacionales nativos de preconjugación de Bm86Dock y la proteína multimérica de autoensamblaje se conservan después de la conjugación y el autoensamblaje, creando así una nanopartícula que es una vacuna eficaz. En algunos aspectos de las modalidades, las nanopartículas que tienen un tamaño que varía entre 20 y 200 nm se pueden drenar de manera efectiva a los ganglios linfáticos, lo que facilita una mejor absorción por parte de las células presentadoras de antígeno (APC), lo que aumenta las respuestas celulares [de Pinho Favaro et al., Recombinant vaccines in 2022: a perspective from the cell factory, Microb. Cell Factories 21, 203 (2022)].

En algunas modalidades, la composición inmunogénica o vacuna se puede administrar en un sujeto mediante inyección (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular) u oral, y puede incluir Bm86Dock-NP como un ingrediente activo en una cantidad eficaz. Se entiende que la cantidad eficaz adecuada de Bm86Dock-NP, así como el régimen de dosificación, pueden ser ajustados y optimizados por un veterinario, a la luz de las circunstancias pertinentes. Un régimen de dosificación para la profilaxis puede comprender, por ejemplo, administrar como una serie de sensibilización al menos 2 dosis de composición inmunogénica con un intervalo de aproximadamente 3 a 4 semanas, seguido de una serie de refuerzo de entre 1 a 4 dosis, cada una administrada con un intervalo de 4, 6 meses a 1 año. La primera inyección de refuerzo se puede administrar 3, 4 o 6 meses después de recibir la última dosis de la serie Prime. Otro régimen de dosificación puede comprender administrar como una serie de sensibilización 3 dosis (1X) de composición inmunogénica con aproximadamente 30 días de diferencia, seguido de un refuerzo de 1 dosis doble (2X) administrada 4 meses después de la última dosis de sensibilización recibida.

Un sujeto puede ser mamíferos domésticos tales como un ratón, un perro o un gato o ganado tal como una vaca, una oveja, un caballo, un camello, una llama y un dromedario o un animal salvaje tal como un capibara, un ciervo o un pájaro.

En algunas modalidades, la composición inmunogénica o vacuna se puede preparar mediante el uso de aditivos farmacéuticamente adecuados y fisiológicamente aceptables, además del ingrediente activo, y los aditivos pueden incluir excipientes, desintegrantes, edulcorantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes de soplado, lubricantes, deslizantes, agentes saborizantes, etc.

En algunas modalidades, la formulación de la composición inmunogénica comprende Bm86Dock-NP, amortiguador de Tris-NaCl a pH 8, gel de montanida 01 PR 15 % V/V. En algunas modalidades, la formulación de la composición inmunogénica comprende Bm86Dock-NP, amortiguador Tris-NaCl a pH 8, Alhydrogel® 0,2 % con o sin NaPO<sub>4</sub>.

En algunas modalidades, la vacuna o composición inmunogénica puede bloquear la transmisión de patógenos transmitidos por garrapatas de la garrapata al huésped al interferir con mecanismos moleculares específicos.

En algunas modalidades, la composición inmunogénica se utiliza como una vacuna para el tratamiento o la prevención de infestaciones por garrapatas y la transmisión de enfermedades transmitidas por garrapatas. Las enfermedades transmitidas por garrapatas son Babesiosis, Anaplasmosis, Citauxzoonosis, Ehrlichiosis, enfermedad de Lyme, enfermedad de erupción cutánea asociada a garrapatas del sur, Rickettsiosis, fiebre recidivante transmitida por garrapatas, *enfermedad de Borrelia mayonii*, tifus, tularemia, encefalitis transmitida por garrapatas, enfermedad del virus Powassan, fiebre de garrapatas de Colorado, virus Heartland, virus Bourbon, enfermedad forestal de Kyasanur, fiebre hemorrágica de Omsk, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, enfermedad febril grave, parálisis por garrapatas y síndrome alfa-gal.

## EJEMPLOS

La invención se describe en la presente mediante el siguiente ejemplo no taxativo representativo destinado solo a enseñar a los expertos en la técnica la mejor manera conocida por los inventores de hacer y usar la invención. Nada en este ejemplo o memoria descriptiva debe considerarse como limitante del alcance de la presente invención. Las modalidades específicas de la invención descritas pueden modificarse o variarse, sin apartarse de la invención, tal como lo aprecian los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto, debe entenderse que, dentro del alcance de las reivindicaciones y sus equivalentes, la invención puede ponerse en práctica de otra manera que la descrita específicamente.

### **Ejemplo 1: Expresión y purificación de Bm86Dock a partir de *E. coli* y células de mamífero.**

La expresión periplasmática de Bm86Dock en *E. coli* se realizó con la construcción pelB-Bm86Dock y la expresión citoplasmática con la construcción Trx-Bm86Dock. La secuencia de nucleótidos de Bm86Dock con la etiqueta peptídica (SEQ ID NO: 5) se optimizó por codones y se sintetizó para la expresión de *E. coli*. El ácido nucleico se clonó entre sitios *Bam*HI en el vector pT7pelB [Ortega et al., Multi-Compartment and Multi-Host Vector Suite for Recombinant Protein Expression and Purification, Front. Microbiol. 9, (2018)] y pT7Trx [Correa et al., Generation of a vector suite for protein solubility screening, Front. Microbiol. 5, 67 (2014)] con orientación del promotor T7 para generar pelB-Bm86Dock y Trx-Bm86Dock, respectivamente. **La Figura 3** muestra SDS-PAGE al 15 % con las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación de la siguiente manera: MW, peso molecular (con el peso indicado para las bandas relevantes); BC, fracción soluble (antes de la columna); FT, flujo continuo; W, fracción de lavado de IMAC; Elu, fracción eluida de IMAC. Como se muestra en la **Figura 3A**, ambas construcciones se purificaron con éxito a partir de las fracciones solubles mediante IMAC. SDS-PAGE 15 % de la tubería de purificación completa de Trx-Bm86Dock muestra: MW, peso molecular (con el peso indicado para las bandas relevantes en el lado del gel), W, fracción de lavado de IMAC, Elu, fracción eluida de IMAC, E2, fracción eluida de segundo IMAC después de la escisión de TEV, C, fracción escindida con proteasa de TEV, FT2, segundo IMAC de

forma de flujo continuo después de la escisión de TEV, BC-SE, muestra antes de la purificación por exclusión de tamaño,  $V_0$ , volumen vacío, Grupo-SE, picos agrupados (86,5 y 94,7 ml). El cromatograma como se ve en la **Figura 3B** corresponde a una cromatografía de exclusión por tamaño en un Superdex 200 16/60 equilibrado con PBS. Las flechas indican que los volúmenes de elución para diferentes estándares son  $V_0$ , volumen vacío determinado con dextrano azul (>700 kDa), BSA (66 kDa) y lisozima (13 kDa). Los volúmenes eluidos para los diferentes picos se indican en el cromatograma.

Bm86Dock se produjo tanto en el periplasma como en el citoplasma de *E. coli* como una proteína soluble, así como una proteína secretada de células de mamífero. Para la expresión citoplasmática y periplasmática en *E. coli*, el ácido nucleico del polipéptido modificado se insertó en los plásmidos pT7Trx [Correa et al., Generation of a vector suite for protein solubility screening, Front. Microbiol. 5, 67 (2014)] y pT7pelB [Ortega et al., Multi-Compartment and Multi-Host Vector Suite for Recombinant Protein Expression and Purification, Front. Microbiol. 9, (2018)] y se transfectaron en las cepas Shuffle y BL21(DE3), respectivamente. Para la expresión en mamíferos, el ácido nucleico que codifica el polipéptido Bm86Dock se clonó en el vector pCMVExFc [Ortega et al., Multi-Compartment and Multi-Host Vector Suite for Recombinant Protein Expression and Purification, Front. Microbiol. 9, (2018)] y se transfectaron en células HEK293. En todos los casos, la proteína incluyó un HisTag para la purificación mediante cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC). Después de la purificación de IMAC, la proteína se trató con proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) [Rizza et al., Production, purification and characterization of a double-tagged TEV protease, Protein Expr. Purif. 191, 106021 (2022)] para escindir y eliminar mediante un segundo IMAC la proteína HisTag/fusión de Bm86Dock. (**Figura 3A**) Después de la escisión y purificación de TEV, Bm86Dock permaneció soluble. Además, la proteína se comportó principalmente como un monómero como se ve por filtración en gel. (**Figura 3B**) La secuencia y las características estructurales relevantes, tales como los dos enlaces disulfuro esperados en la estructura 3D predicha (**Figura 4A**), se confirmaron mediante espectrometría de masas. (**Figuras 4B-4C**) Bm86Dock también se expresó y secretó adecuadamente a partir de células de mamífero. (**Figura 4C**) Este sistema de expresión también permitió confirmar la presencia de modificaciones postraduccionales de glicano como se sugirió teóricamente, que se eliminaron después del tratamiento con PNGasa F. Este resultado confirmó además que los residuos glicosilados se expusieron como se esperaba de acuerdo con la estructura 3D predicha.

### **Ejemplo 2: Caracterización biofísica de Bm86Dock y Bm86Dock002**

Las estructuras bien plegadas de Bm86Dock y Bm86Dock002 expresadas se confirmaron adicionalmente mediante dicroísmo circular (**Figura 7A**). Los espectros mostraron imágenes características de elementos de estructura secundaria en proteínas plegadas. La similitud en los

espectros indicó la conservación de la estructura y los epítomos conformacionales entre Bm86Dock y Bm86Dock002. Tras la adición de concentraciones crecientes de urea como agente desnaturizante, se perdió la estructura 3D (**Figura 7B**). A una concentración de urea 8 M, la proteína se desnaturizó, lo que interrumpió las interacciones no covalentes que mantienen unida la forma plegada, causando esencialmente que la proteína se desplegara, lo que resultó en la pérdida de cualquier epítomo conformacional. El análisis de las curvas de despliegue térmico mostró temperaturas de fusión de 70° C y 84° C para Bm86Dock y Bm86Dock002, respectivamente (**Figura 7C**).

### **Ejemplo 3: Acoplamiento covalente de Bm86Dock y Bm86Dock002 a una nanopartícula de proteína (NP) mediante métodos de ligación in vitro**

Bm86Dock y variantes como Bm86Dock002 se expresaron con éxito como proteínas individuales y de fusión que validaron sus estructuras 3D predichas. La versatilidad de Bm86Dock como módulo inmunogénico se corroboró acoplándolo covalentemente a una nanopartícula. Una versión etiquetada de Bm86Dock (Bm86Dock-SpyTag003, [SEQ ID NO: 5]) se acopló a un andamio de lumazina sintasa fusionado con SpyCatcher003 N-terminal (SEQ ID NO: 8). De manera similar, una versión etiquetada de variantes tales como Bm86Dock002 (Bm86Dock002-SpyTag003, (SEQ ID NO: 6) se acopló a un andamio de lumazina sintasa fusionado con SpyCatcher003 N-terminal (SEQ ID NO: 8). Dicho diseño permite la visualización de 60 copias de Bm86Dock o Bm86Dock002 en la superficie externa de la nanopartícula. Después de la ligación in vitro, las nanopartículas funcionalizadas Bm86Dock-NP y variantes como Bm86Dock002-NP se calentaron a 100 °C y se procesaron en un gel desnaturizante, lo que demuestra la irreversibilidad del acoplamiento. (**Figura 6**)

Las bandas relevantes se muestran en el gel SDS-PAGE 15 % con el marcador MW para confirmar sus tamaños. Se incubaron Bm86Dock y Bm86Dock002 con NP a una relación molar de 1,5:1 durante 16 horas a 4 °C. (**Figura 6**)

### **Ejemplo 4: Inmunogenicidad mejorada de Bm86Dock002 en comparación con Bm86Dock después de la inmunización**

Para cada inmunógeno Bm86Dock002 y variantes tales como Bm86Dock, se inmunizaron cinco animales en los días 0, 21 y 42 con 100 µg de proteína en un volumen de 2 mL de Tris 12,5 mM pH 8,0, NaCl 150 mM y gel de montanida 01 PR 15 % V/V. Se tomaron muestras de sangre los días 0 (preinmunes) y 62. La diferencia informada en los títulos de anticuerpos IgG entre los días 0 y 62 para Bm86Dock se midió mediante ELISA. Como se muestra en **la Figura 8**, los títulos de IgG son más altos en los animales vacunados con Bm86Dock002 que en Bm86Dock, lo que sugiere que las variantes tales como Bm86Dock002 provocan una respuesta inmunitaria más fuerte que Bm86Dock.

### **Ejemplo 5: Comparación de la inmunogenicidad de las vacunas Bm86Dock-NP formuladas con diferentes adyuvantes**

Se vacunaron grupos de seis animales con Bm86Dock-NP los días 0, 21 y 42 con 200 µg de proteína

en un volumen de 2 mL de Tris 12,5 mM pH 8,0, NaCl 150 mM y gel de montanida 01 PR 15 % V/V, o Alhydrogel® 0,2 %, o Alhydrogel® 0,2 % con NaPO<sub>4</sub> 80 mM. Se tomaron muestras de sangre los días 0 (preinmunes) y 62. La diferencia informada en los títulos de anticuerpos IgG entre los días 0 y 62 para Bm86Dock se mide mediante ELISA. Como se muestra en la **Figura 9**, los títulos de IgG son más altos en animales inmunizados con la vacuna Bm86Dock-NP formulada con Alhydrogel® en comparación con la vacuna formulada con Montanide Gel o Alhydrogel® / NaPO<sub>4</sub>, lo que sugiere una respuesta inmune protectora mejorada con la vacuna formulada con Alhydrogel®.

#### **Ejemplo 6: Bm86Dock-NP provoca una respuesta inmunitaria en animales inmunizados**

La inmunogenicidad de Bm86Dock y Bm86Dock-NP se probó en ganado de un campo experimental en Migués-Canelones, Uruguay. Se inocularon dos animales por antígeno con una dosis de 100 µg con adyuvante Montanide Gel 01 PR, Seppic a una concentración final del 15 % los días 0, 30 y 60. Los sueros recolectados en los días 0 (preinmunes) y 90 se utilizaron para las pruebas de inmunogenicidad. Tanto Bm86Dock como Bm86Dock-NP demostraron ser inmunogénicos. (**Figura 10**) Sorprendentemente, se obtuvieron títulos de anticuerpos similares con Bm86Dock y Bm86Dock-NP, a pesar de reducir la cantidad de antígeno en la formulación de nanopartículas en 4 veces (Bm86Dock-NP). Este resultado destacó los beneficios de la funcionalización del antígeno.

#### **Ejemplo 7: Eficacia de Bm86Dock-NP**

El diseño experimental se basó en guías de [ Ndawula, From Bench to Field: Una guía para formular y evaluar vacunas contra garrapatas que van más allá de la eficacia a la efectividad, vacunas. 9, 1185 (2021)]. La eficacia de Bm86Dock-NP se probó en un campo ubicado en Rivera, Uruguay. Se separaron dos grupos de 20 animales cada uno, correspondientes a novillas de 1 año de edad, uno se probó con la formulación de vacuna y el otro se vacunó solo con adyuvante, como control. Ambos grupos se gestionaron por separado en dos potreros diferentes con características similares. Un mes antes de comenzar el ensayo, los animales fueron tratados con hemovacuna, para protegerlos contra el complejo de tristeza bovina y también con acaricidas para definir un punto de partida. Se administraron tres dosis de 2 ml, cada una con 100 µg de Bm86Dock-NP, por vía intramuscular en la región media del cuello a intervalos de 30 días. A los 180 días, se administró una dosis de refuerzo en las mismas condiciones que antes usando 200 µg de Bm86Dock-NP (**Figura 11A**). Se tomaron muestras de sangre periódicas para cada animal para el análisis serológico, y se controlaron los números de garrapatas para cada animal (**Figuras 11B-11C**). Además, se recolectaron garrapatas hembras hinchadas de animales para realizar pruebas de viabilidad de garrapatas (puesta de huevos y eclosión de huevos) (**Figura 11D**). Los parámetros evaluados para la estimación de la eficacia fueron TF (alimentación de garrapatas), TE (puesta de huevos), TH (incubabilidad de huevos). La eficacia total se estimó mediante la fórmula:  $E \% = 100 * [1 - (ETF * ETE * ETH)]$ , mientras que la eficacia sobre la fertilidad se estima mediante la fórmula:  $100 * [1 - (ETE * ETH)]$ . Cuando ETF se define como

$TF_{\text{vacunado}}/TF_{\text{control}}$ , ETE se define como:  $TE_{\text{vacunado}}/TE_{\text{control}}$  y ETH se define como  $TH_{\text{vacunado}}/TH_{\text{control}}$ .

La vacuna demostró tener una alta eficacia tanto en un grupo seleccionado de animales de alta respuesta inmune (#7, #8, #12 y #20) como en el grupo.

Las modalidades ilustradas y discutidas en esta descripción pretenden solo enseñar a los expertos en la técnica la mejor manera conocida por los inventores de hacer y usar la invención. Nada en la presente descripción debe considerarse como limitante del alcance de la presente invención. Todos los ejemplos presentados son representativos y no limitativos. Las modalidades de la invención descritas anteriormente pueden modificarse o variarse, sin apartarse de la invención, tal como lo aprecian los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto, debe entenderse que, dentro del alcance de cualquier reivindicación respaldada por la descripción y sus equivalentes, la invención puede ponerse en práctica de forma distinta a la descrita específicamente.