



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 430**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01927509 .8**
96 Fecha de presentación : **04.05.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1289545**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2003**

54 Título: **Vacuna sintética para el control de garrapatas.**

30 Prioridad: **04.05.2000 BR 0017175**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.06.2011

73 Titular/es: **Universidade Federal de Viçosa
Campus Universitário
CEP-36571-000, Viçosa, MG, BR
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
Minas Gerais**

72 Inventor/es: **Patarroyo Salcedo, Joaquim, Hernán;
Vargas Vilorio, Marlene, Isabel;
Alencar Prates, Aline;
Dias Mendes, Marcio, Alberto;
Guzmán, Fanny;
Dias Portela, Ricardo, Wagner;
De Castro Oliveira, Ricardo y
Patarroyo Murillo, Manuel, Elkin**

74 Agente: **Toro Gordillo, Francisco Javier**

ES 2 360 430 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 sintética para el control de garrapatas.

Campo de la invención

La presente invención está dirigida a una vacuna sintética contra garrapatas y a una composición medicamentosa de dicha vacuna. Está íntimamente relacionada con los campos de biotecnología de proteínas, inmunología y, particularmente, con la construcción de inmunógenos sintéticos los cuales dan como resultado, cuando se inoculan en el ganado, la producción por el ganado de una respuesta inmune capaz de lesión a las garrapatas que se alimentan sobre los bovinos inoculados, reduciendo el número de garrapatas, su peso y capacidad de reproducción, hasta un grado tal que el inmunógeno construido puede usarse como una vacuna eficaz para el control de garrapatas en bovinos.

Antecedentes de la invención

La garrapata *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), que pertenece a la familia Ixodidae, es el ectoparásito bovino principal en Brasil y en todos los países tropicales y subtropicales. Este parásito está extremadamente bien adaptado al clima de una gran parte del país y, emparejado con la presencia de sus huéspedes distribuidos sobre más del 80% del territorio de la nación, constituye un problema principal para la cría de ganado en Brasil. Las pérdidas asociadas no se limitan a la caída de la producción que resulta de la intensa hemorragia, sino también puede estar relacionada con otros daños tales como la inoculación de toxinas procedentes de las glándulas salivares, depreciación de los cueros, influencia en la capacidad productiva de los animales y, principalmente, la transmisión de diversos microorganismos que causan enfermedades las cuales afectan seriamente la cría de ganado en la nación, tal como *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, con participación igualmente en la epidemiología del *Anaplasma marginale*.

El daño al ganado causado por garrapatas se manifiesta por sí mismo mediante diversas acciones típicas, tales como daño directo por la intensa hemorragia originada fundamentalmente por las garrapatas hembra, y la cual puede ser tan alta como de 0,6 a 3 ml por hembra adulta. Básicamente, esto da como resultado pérdidas de producción, y se han realizado diversos ensayos para evaluar esta situación. En 1987 (HOLROYD y otros, Australian Journal of Experimental Agriculture, vol. 28, págs. 1-10) observaron que los animales que no habían sido tocados por las garrapatas habían ganado un promedio de 17 kg a lo largo de un período de tres años, comparados con los animales expuestos al parásito. En Brasil (BRANCO y otros, Coletânea de Pesquisas EMRAPA/CNPQ, págs. 229-234, (1987)), encontró una ganancia en peso promedio de 34,5 kg en ganado Hereford. En el país, FURLOG en 1996, observó una reducción en la producción láctea en sucesivas infestaciones crecientes. JONSSON y otros (Veterinary Parasitology, vol. 78, págs. 66-77, (1998)) han estimado que cada hembra adulta sería responsable de una caída de 8,9 ml en la producción de leche diaria y de 1,0 g en la pérdida de peso.

La pérdida causada por la picadura de la garrapata y la consecuente inflamación local, afectan negativamente el valor de la piel, lo cual es de gran importancia en áreas tradicionales de la producción de cueros.

La inoculación de toxinas cuando succiona la sangre, componentes naturales de la saliva de la garrapata tales como inhibidores de prostaglandinas y otros moduladores de la respuesta inflamatoria, puede conducir a una reacción de hipersensibilidad, parálisis de los miembros e incluso a hipotrofia testicular.

Como ejemplos de la transmisión de agentes patógenos, los importantes en Brasil son los protozoos *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, con participación también en la epidemiología del *Anaplasma marginale* (PATARROYO, Revista de Patología Tropical, vol. 23, págs. 145-146, (1994)).

Igualmente, se debe incluir como pérdidas para la industria ganadera brasileña los costes del control directo de garrapatas y de las enfermedades para las cuales son portadores. HORN y ATECHE (A Hora Veterinária, vol. 4, págs. 12-32, (1985)) han estimado las pérdidas directas e indirectas en 800 millones de dólares. El Ministro de Agricultura, en un informe que cubre los dos años 1983/1984, eleva dicha cantidad a mil millones de dólares anuales, de los cuales el 40% representa las pérdidas en la producción láctea. Un artículo de HORN en 1988 ("Programa nacional de controle de parasitoses", en Curso de Parasitología Animal, vol. 2, págs. 21-42), menciona gastos de 13.800.000,00 dólares americanos en acaricidas, lo cual representaría el 15% del coste total nacional de protección.

Hasta el presente, se han usado un cierto número de vías para el control de garrapatas y el tratamiento de bovinos con acaricidas, los cuales son sustancias químicas que matan las garrapatas. Esta metodología de control es desventajosa dado que se ha desarrollado una resistencia contra las sustancias químicas en diversas poblaciones de garrapatas, lo cual necesariamente conduce a la introducción de nuevas sustancias químicas para el control; la frecuencia de tratamientos químicos en un intento de lograr un control eficaz de garrapatas en los rebaños de ganado; el perjuicio que dichas sustancias químicas pueden causar a los animales, a la salud humana y al medio ambiente. Otra alternativa son los cruzamientos de *Bos taurus taurus* y *Bos taurus indicus*, pero estos híbridos tienen una menor capacidad productiva que las crías puras, específicamente en el caso del ganado lechero, siendo necesario el uso de sustancias químicas para controlar su interrupción antes del aumento de la resistencia de las garrapatas en dichos cruzamientos. Otra alternativa además propuesta para el control es el uso de pastos que funcionarían en la fase no parasítica del parásito. La rotación de pastos se ha considerado igualmente como una opción ya

que, dependiendo del tiempo de descanso de cada porción de pasto, las larvas nacidas consumirían sus reservas alimenticias y morirían antes de instalarse ellas mismas en un huésped. Igualmente, se ha investigado el uso de predadores de garrapatas naturales tales como pájaros zanquilargos y aves de rapiña, pero no se conocen aún los riesgos de la introducción de dichos animales en la cadena biológica y alimentaria. La hormiga *Pheidole megacephala* ha sido el sujeto de investigación como una alternativa de menos impacto ecológico. Igualmente, se han analizado parásitos naturales tales como algunas bacterias y hongos de las especies *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Otro intento para el control ha sido el uso de cruzamientos interespecíficos de especies de garrapatas para generar machos estériles, pero la frecuencia de cruzamientos intraespecíficos fue superior a la de los cruzamientos interespecíficos. Todos los sistemas mencionados tienen problemas de naturaleza práctica, desde los puntos de vista económicos y/o ecológicos, lo cual evita su uso en la mayor parte de las áreas geográficas de cría de ganado vacuno.

En contraste con la descripción anterior, la posibilidad de uso de una vacuna eficaz para el control de garrapatas constituye una alternativa atractiva comparada con los procedimientos disponibles y en uso actualmente.

Se han realizado diversos intentos para obtener inmunización contra la infestación de garrapatas en bovinos. Con el fin de identificar el componente proteínico y el órgano en el cual podría encontrarse el factor inmunógeno protector, se usaron extractos de larvas, tejido nervioso, hemocitos, hemolinfa, tracto genital, y huevos de *Boophilus microplus*, pero estos intentos fueron infructuosos (DAVIDSON, S., Rural Research, vol. 128, págs. 4-8, (1985); OPDEBEECK y otros, Immunology, vol. 63, págs. 363-367, (1988)).

Finalmente, en 1989, (WILLADSEN y otros, Journal of Immunology, vol. 143, págs. 1346-1351) aislaron y purificaron una proteína que imita la alteración encontrada con los extractos de garrapata en bruto. Dicha glucoproteína se la designó como Bm86, con un peso estimado de 89 kDa y un pI de 5,5. Posteriormente, se determinó la secuencia de aminoácidos de esta proteína, y se encontró que la secuencia estaba compuesta de 650 aminoácidos, de los cuales el 10% fueron cisteína, mostrando una gran analogía con el factor de crecimiento de la epidermis humana (RAND y otros, Proceedings of the National Academic Sciences USA, vol. 86, págs. 9657-9661, (1989)).

Los resultados de cromatografía y generación de antisueros específicos a Bm86, han sido descritos por SHARP y otros en J. Chromatography, vol. 512, págs. 189-202, (1990).

Mediante técnicas inmunohistoquímicas y paneles monoclonales, se determinó la localización y distribución de Bm86 en el intestino de las garrapatas, y se encontró en las microvellosidades de la membrana de las células epiteliales del intestino y altamente concentrado cerca de la membrana basal (GOUGH y KEMP, Journal of Parasitology, vol. 79, págs. 900-907, (1993); LEE y OPDEBEECK, International Journal of Parasitology, vol. 25, págs. 241-248, (1994)).

Los ensayos de vacunación con esta proteína reportados muestran que los anticuerpos producidos en bovinos contra la proteína, así como los generados mediante la inoculación de extractos de intestino de garrapatas, son agresivos para el epitelio intestinal del parásito, causando un daño irreparable que posteriormente afecta al ciclo biológico de este ectoparásito.

Se han realizado estudios genéticos que han propiciado la producción a gran escala de la proteína a través de la clonación del ADN que codifica la Bm86 tales como *Escherichia coli* (TELLAM y otros, Animal Parasite Control Using Biotechnology, págs. 303-331, (1992)), como *Aspergillus nidulans* y como Baculovirus (TURNBULL y otros, Applied Environmental Microbiology, vol. 56, págs. 2847-2852, (1990); TELAMM y otros, (1992)), así como ensayos de vacunación, con una protección de hasta el 70% en algunos casos, dando como resultado una disminución del desarrollo de garrapatas y afectando a su ciclo biológico. Posteriormente, en 1994 se lanzó comercialmente la primera vacuna contra garrapatas, denominada TickGard[®], mediante técnicas de ingeniería genética en *E. coli* (SMITH y otros, (1995)).

En 1994, se lanzó la segunda vacuna comercial contra *Boophilus microplus* bajo el nombre comercial Gavac[®], desarrollada por grupos de investigación cubanos, los cuales expresaron Bm86 en la levadura *Pichia pastoris* (RODRIGUEZ y otros, Journal of Biotechnology, vol. 33, págs. 135-146, (1994)).

La tercera vacuna vendría en 1996, la TickGard Plus[®], la cual había sido ensayada con éxito en diversas crías bovinas (WILLADSEN y otros, Veterinary Parasitology, vol. 71, págs. 209-222, (1997)).

No obstante la descripción anterior, en la cual se muestra que el uso de inmunógenos comerciales puede dar como resultado la reducción significativa de infestación, estos no ofrecen aún los niveles de protección que haría el uso de acaricidas convencionales.

Los procedimientos de purificación y obtención de inmunógenos para garrapatas *in nature* requieren un procedimiento extremadamente amplio y complejo. Por otra parte, la obtención de proteínas recombinantes requiere la inconveniente preparación y manipulación de extensos cultivos de células, ya sea la fermentación o bien otros destinados a la obtención del material proteínico necesario para la inmunización en masa, lo cual es costoso y puede implicar problemas técnicos altamente complejos.

La obtención de nuevos inmunógenos que puedan funcionar como alternativos y/o complementos a los anteriormente descritos representa un avance considerable en el desarrollo de vacunas eficaz.

5 En este contexto, los presentes autores pueden observar la propensión hacia nuevas investigaciones, impulsadas por el reciente progreso del conocimiento en áreas de la inmunología, bioquímica, biología celular y biotecnología, para el control de estos parásitos por vacunación.

10 Teniendo en cuenta el hecho que una proteína puede tener varios epítomos en su estructura, los cuales pueden actuar o no como factores de protección, y los cuales pueden ser incluso un mecanismo de imitación del parásito para evitar la respuesta inmune, sería grandemente ventajoso el usar vacunas que tengan epítomos determinados y caracterizados, puesto que esto evitaría algunos problemas causados por los epítomos que no son necesarios para el desarrollo de protección e inmunidad contra el parásito, tales como supresión de mecanismos alérgicos y auto-inmunes, y mecanismos de evasión típicos de microorganismos.

15 De acuerdo con ello, una vacuna para el control de garrapatas basada en la síntesis química de un inmunógeno sería más ventajosa que una vacuna recombinante, tal como alta pureza, puesto que no requiere técnicas de purificación costosas y complejas, su completa caracterización química, su seguridad debido a la ausencia de contaminantes, completa reproducibilidad a gran escala, alta estabilidad, puesto que no contiene enzimas y otros materiales proteínicos obtenidos de otros materiales biológicos, lo cual hace su almacenamiento más fácil, y a un menor coste de producción a una escala industrial.

Sumario de la invención

20 La novedad de la presente invención consiste en el diseño y construcción de dos inmunógenos sintéticos constituidos por una secuencia continua y definida de cuarenta y tres (43) aminoácidos que se encuentran en diferentes posiciones en la secuencia de la proteína Bm86, su polimerización con cisteínas en el N-terminal y el C-terminal, la composición medicamentosa basada en dicho polipéptido(s) sintético y la vacuna obtenida de este modo.

25 Por ello, el objeto de la presente invención está que consiste en la secuencia continua y definitiva de los cuarenta y tres aminoácidos, la forma de su polimerización que usa cisteína en sus terminales, su composición medicamentosa, que constituye, de este modo, el inmunógeno sintético que puede ser usado de manera ventajosa en el control, mediante inmunoprofilaxis, de la garrapata bovina *Boophilus microplus*.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra las cinéticas de anticuerpos en animales inmunizados mediante el péptido SBm4912.

La Figura 2 muestra cinéticas de anticuerpos en animales inmunizados mediante el péptido SBm47462.

Descripción detallada del mejor modo de la invención

30 Los péptidos se formaron teniendo en cuenta la estructura de la proteína Bm86. La elección de estos péptidos dentro de la estructura de la proteína integrada se ha basado en los estudios de predicción por ordenador de sitios inmunógenos en base a las propiedades de la proteína, tal como antigenicidad (HOOP y WOODS, Proceedings of the National Academy of Science, USA, vol. 78, págs. 3824-3828, (1981)), potencial de las hélices alfa y beta de la Hoja Beta (CHOU y FASMAN, Advances of Enzimology of Relative Areas in Molecular Biology, vol. 47, págs. 45-148, (1978)), hidrofobicidad y propiedades hidrofílicas (KYTE y DOOLITTLE, Journal of Molecular Biology, vol. 157, págs. 105-132, (1982)).

40 La síntesis se llevó a cabo de acuerdo con una técnica conocida tal como ha sido descrita por MERRIFIELD (Journal of the American Chemical Society, vol. 85, pág. 2149, (1963)). La metodología usada fue la del Good Manufacture Procedure (GMP), en el cual se usa un soporte sólido, en nuestro caso resina MBH4 (4-metilbencidrilamina) con un coeficiente de sustitución de 0,49 meq/g, pesada de acuerdo con la cantidad de péptidos a sintetizar y los aminoácidos protegidos en sus cadenas laterales mediante el grupo t-boc (terc-butilcarbonilo). La resina se introdujo en una bolsa de polietileno, la cual se selló térmicamente. Se agregó una solución de 100 ml de diisopropiletilamina (DIEA) al 5% en diciohexilcarbodiimida (DCC) para activar la resina. La bolsa se secó y se agregaron una solución del primer aminoácido disuelto en disolvente diclorometano (DCM) o una solución de dimetilformamida (DMF) más el activador DCC, dependiendo la cantidad de aminoácido de su peso molecular y de la cantidad y tipo de la resina usada. Estos se incubaron y agitaron durante una hora a temperatura ambiente. Después de esta incubación, la bolsa de material sintético se sacó, se cortó uno de los extremos y se retiró una pequeña porción de la resina para comprobar el completo acoplamiento del aminoácido con la resina, mediante el ensayo de la ninhidrina. Con el ensayo positivo, se repitió el acoplamiento usando hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT). Con el ensayo negativo, se continuó la síntesis, mediante la adición de 100 ml de ácido trifluoroacético (TFA) en DCM para anular la protección de los grupos amino, lavando con DCM e isopropanol e incubación con el siguiente aminoácido de la secuencia péptida. Al final de la síntesis, el material se sometió a escisiones para eliminar los grupos t-boc y la resina, y a cromatografía por HPLC para determinar el nivel de eficacia y pureza de la síntesis, liofilizándose posteriormente y, a continuación, almacenándose en tubos *Eppendorf* conteniendo 40 mg a la temperatura de -20°C.

Con el fin de ensayar la capacidad de los péptidos en la inducción de una respuesta inmune protectora, se inocularon terneros *Bos taurus taurus* de 8 a 10 semanas de edad. Estos animales se mantuvieron aislados, libres de la infestación de garrapatas, moscas y otros ectoparásitos. Estos animales se separaron en cuatro grupos, con cuatro animales en cada grupo.

- 5 Grupo 1 – Control, los cuales se inocularon con 4 ml de agua estéril milliQ, vía subcutánea, en tres (3) dosis, la primera el día cero (0), la segunda el día 30 y la tercera el día 60.

Grupo 2 –Saponina, inoculados con 1,5 mg de adyuvante saponina diluida en 4 ml de agua estéril milliQ, administrado vía subcutánea en las mismas fechas de inoculación del Grupo de Control.

- 10 Grupo 3 –Inoculado con el péptido sintético denominado SBm4912 (*Boophilus microplus* 4912 sintético), en una solución de 2,0 mg de péptido sintético y 1,5 mg de adyuvante saponina, diluido en 4 ml de agua estéril milliQ, administrado vía subcutánea, siguiendo el mismo esquema de tiempos establecido para los otros grupos.

Grupo 4 – Inoculado con el péptido sintético denominado SBm7462 (*Boophilus microplus* 7462 sintético), inoculado con 4 ml de una solución que contenía 1,5 mg de adyuvante saponina y 2,0 mg de péptido sintético diluido en agua estéril milliQ, administrado vía subcutánea las mismas fechas que los grupos precedentes.

- 15 Los animales estuvieron constantemente monitorizados dos veces al día durante cinco días después de la inoculación con el fin de comprobar posibles reacciones de hipersensibilidad cutánea a los péptidos y al adyuvante. Para identificar posibles efectos hemofílicos de los péptidos (CALVO y otros, Peptides Research, vol. 4, págs. 324-333, (1991)), además de la inspección visual diaria del punto de inoculación, se hicieron ensayos de hematocritos en todos los animales dentro de los cinco días siguientes a la inoculación.

- 20 Después de 21 días de la última inoculación, los animales se expusieron con larvas de *Boophilus microplus* en cantidades de 1500 larvas por día durante tres días sucesivos, hasta un total de 4500 larvas por animal.

Las observaciones clínicas se realizaron semanalmente hasta el día dieciocho y, después de este, diariamente, para comprobar el desarrollo y predecir el día probable en que comenzaría el desprendimiento de las hembras adultas.

- 25 El día veintiuno, cuando las hembras comenzaron a caer, se inició un procedimiento para recoger todas las hembras adultas encontradas sobre el suelo de los establos, en el comedero y sobre la rejilla de eliminación de aguas residuales. Para una recogida más cuidadosa, el establo se lavó dos veces al día y la totalidad del material resultante del lavado se tamizó y las hembras adultas se separaron e identificaron de acuerdo con el establo del que provenían y el grupo de inoculación. A continuación, las hembras se empaquetaron e identificaron individualmente. Cada hembra se pesó en una balanza de precisión y se dejó que pusieran huevos durante 15 días en una estufa B.O.D. a
- 30 27°C y 80% de humedad (OBA, Revista da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, vol. 13, págs. 409-420, (1976)), en cuyo momento se pesaron los huevos de cada garrapata. Estos huevos se cortaron en 20 porciones de 75 mg cada una (1500 huevos) por grupo y se incubaron durante 30 días en una estufa B.O.D., con observación diaria del proceso de eclosión. A continuación, las larvas se pesaron en una balanza de precisión (MASSARD y otros, Revista Brasileira de Medicina Veterinária, vol. 17, págs. 167-173, (1995)). Para confirmar el
- 35 efecto de los inmunógenos sintéticos sobre los parámetros biológicos de las garrapatas, se usaron las fórmulas recomendadas por DE LA FUENTE para la rBM86 (“Recombinant vaccines for the control of cattle tick”, Habana: Elpos Scientiae, 280 págs., (1995)) para cada grupo de vacunas y para el grupo de control y el control del adyuvante, tal como se muestra a continuación:

$$DT (\%) = 100 [1 - (NTV/NTC)]$$

- 40 en la que:

DT(%) Por ciento de reducción del número de hembras adultas

NTV Número de hembras adultas por cada grupo de vacuna

NTC Número de hembras adultas en el Grupo de control

$$DR (\%) = 100 [1 - (PMTV/PMTC)]$$

- 45 en la que:

DR(%) Por ciento de reducción del peso promedio de hembras adultas

PMTV Peso promedio de hembras adultas por cada grupo de vacuna

PMTC Peso promedio de hembras adultas en el Grupo de control

$$DO (\%) = 100 [1 - (PMOV/PMOC)]$$

- 50 en la que:

DO(%) Por ciento de reducción del peso promedio del huevo

PMOV Peso promedio del huevo para cada grupo de vacuna

PMOC Peso promedio del huevo en el Grupo de control

DF (%) = $100 [1 - \text{PPLOV}/\text{PPLOC}]$

5 en la que:

DF(%) Reducción en la fertilidad de los huevos

PPLOV Peso promedio de larvas por gramo de huevos en cada grupo de vacuna

PPLOC Peso promedio de larvas por gramo de huevos en el Grupo de control

EF (%) = $100 [1 - (\text{CRT} \times \text{CRO} \times \text{CRF})]$

10 en la que:

EF(%) Eficacia del péptido usado como vacuna

CRT Reducción en el número de hembras adultas

CRO Reducción en la capacidad de la puesta de huevos

CRF Reducción en la fertilidad

15 Con el fin de evaluar las cinéticas de los anticuerpos anti-péptidos producidos en los bovinos inoculados, se extrajeron muestras de sangre. La recogida de sangre de los animales en este experimento siguió el esquema siguiente: dos recogidas semanales antes de la primera inoculación, cuatro recogidas semanales después de la primera inoculación, cuatro recogidas semanales después de la segunda inoculación, y seis recogidas semanales después de la tercera inoculación. El suero obtenido procedente de cada muestra se repartió en partes alícuotas en tubos Eppendorf a -20°C. Las cinéticas se midieron usando el ensayo inmunoenzimático ELISA.

20 En la Tabla 1 se muestran los datos de los parámetros biológicos analizados después del recuento y pesado de las hembras adultas, pesado de los huevos y las larvas, así como los parámetros de la reducción en número y peso de las hembras adultas, el peso de los huevos, la fertilidad y la eficacia.

25 Podría observarse que las hembras adultas liberadas de los animales vacunados con los péptidos sintéticos SBm4912 y SBm7462 tenían un peso menor y estadísticamente diferente de los Grupos de Control y Saponina, no significativamente diferentes entre ellos mismos. En el análisis del peso promedio de los huevos, se encontró que los resultados procedentes de los Grupos 3 y 4 fueron significativamente menores que los del Grupo de Control, y estadísticamente igual entre ellos mismos. En el pesado, la relación de larvas/gramos de huevos, los datos obtenidos fueron similares a los precedentes.

30 En la comparación del porcentaje de factores de reducción en peso y número de hembras adultas, de los pesos de los huevos y las larvas, la conclusión es que con los péptidos SBm4912 y SBm7462 se obtuvo una proporción significativa de reducción y eficacia. Las cinéticas de los anticuerpos anti-péptidos (IgG) parece ser una respuesta inmune IgG típica producida por un antígeno no sintético; en las Figuras 1 y 2 se muestran estos resultados.

Los péptidos SBm4912 y SBm7642 no ocasionaron reacciones adversas ni malestar a los animales inoculados.

35 Ventajas de la solución propuesta:

Una vacuna para el control de garrapatas basada en la síntesis química de un inmunógeno ofrece ventajas tales como:

su alto nivel de pureza dado que no requiere técnicas de purificación costosas y complejas;

su completa caracterización química;

40 seguridad debido a la ausencia de contaminantes;

total reproducibilidad a gran escala;

alta estabilidad ya que no contiene enzimas u otros materiales proteínicos procedentes de otros materiales biológicos, lo cual hace más fácil su almacenamiento;

bajo coste de producción a escala industrial.

La Tabla 1 siguiente muestra los parámetros biológicos de *Boophilus microplus* procedente de animales inoculados con los péptidos sintéticos y procedentes del Grupo de Control y del Grupo de Control con adyuvante. Las letras (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas al nivel de significancia de 0,01% en el Ensayo Tukey.

Tabla 1

Parámetros biológicos	Grupos			
	Control	Saponina	4912	7642
Peso promedio hembras adultas	0,31586 ^a	0,314124 ^a	0,280386 ^b	0,289074 ^b
Peso promedio puesta de huevos	0,159087 ^a	0,16805 ^a	0,111706 ^b	0,115292 ^b
Peso de larvas/gramo de huevos	0,857 ^a	0,828 ^a	0,617 ^b	0,573 ^b
Reducción de peso de hembras adultas (DR)			8,328% ^a	5,448% ^b
Reducción de peso de los huevos (DO)			29,78% ^a	27,53% ^b
Reducción de hembras adultas (DT)			45,39% ^a	60,92% ^b
Reducción de fertilidad (DF)			28,04% ^a	33,2% ^a
Eficacia (EF)			72,4% ^a	81,05% ^b

5 El objeto de esta invención es probable que sea mejorado y modificado, sin apartarse de la esencia del concepto y ámbito de la invención, el cual está limitado al alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10

15

20

25

LISTADO DE SECUENCIAS

I) INFORMACIÓN GENERAL:

I.a) Solicitantes:

(1) Universidade Federal de Viçosa

5 (2) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

I.b) Direcciones:

(1) Campus Universitário 36571-000, Viçosa, Minas Gerais

(2) Rua Raul Pompéia 101 Bairro São Pedro 30330-080, Belo Horizonte, Minas Gerais

II) Título de la invención: "Vacuna sintética para el control de garrapatas"

10 III) NUMERO DE SECUENCIAS: 2 (dos).

IV) INFORMACION GENERAL DE SECUENCIAS:

I.a) INFORMACION PARA SEC ID NO:1

SBm4912 (*Boophilus microplus* 4912 sintético)

15 Peso molecular de 5.057,70 y que consiste en una secuencia continua y definida con cuarenta y cinco (45) aminoácidos que se encuentran en diferentes posiciones en la secuencia de la proteína Bm86 de *Boophilus microplus*

Cys Leu Ser Lys His Val Leu Arg Lys Leu Gln Ala Cys Glu
 His (a.a. 397-410)
 Ser Ser Ile Cys Ser Asp Phe Gly Asn Glu Phe Cys Arg Asn
 Ala (a.a. 21-35)
 Cys Asp Cys Gly Glu Trp Gly Ala Met Asn Met Thr Thr Arg
 Cys (a.a. 132-145) :

Péptido sintético que consiste en la secuencia continua y definida de los aminoácidos C-397-410; 21-35 y 132-145-C.

20 I.b) INFORMACION PARA SEC ID NO:2

SBm7462 (*Boophilus microplus* 7462 sintético)

Peso molecular de 5.057,70 y que consiste en una secuencia continua y definida con cuarenta y cinco (45) aminoácidos que se encuentran en diferentes posiciones en la secuencia de la proteína Bm86 de *Boophilus microplus*

Cys Leu Ser Lys His Val Leu Arg Lys Leu Gln Ala Cys Glu
 His (a.a. 397-410)
 Cys Asp Cys Gly Glu Trp Gly Ala Met Asn Met Thr Thr
 Arg(a.a. 132-145)
 Ser Ser Ile Cys Ser Asp Phe Gly Asn Glu Phe Cys Arg Asn
 Ala Cys (a.a. 21-35)

25 Péptido sintético que consiste en la secuencia continua y definida de los aminoácidos C-397-410; 132-145 y 21-35-C.

30

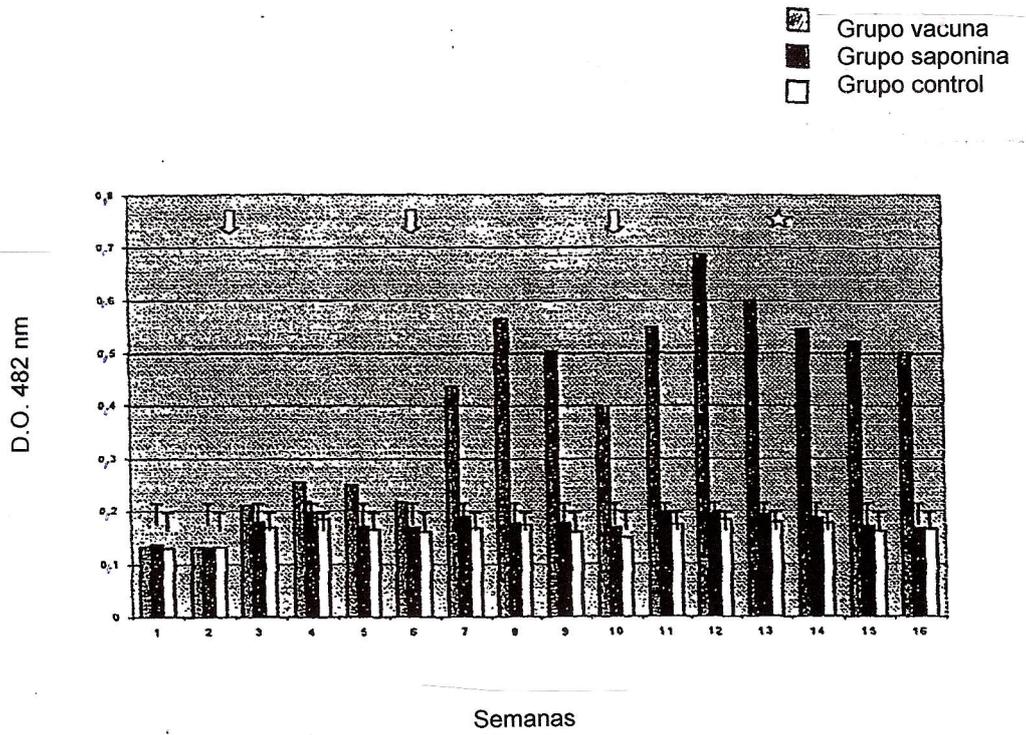
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna sintética contra garrapatas que comprende el inmunógeno sintético SBm4912 (*Boophilus microplus* 4912 sintético), **que consiste en** una secuencia continua y definida con cuarenta y tres (43) aminoácidos que se encuentran en diferentes posiciones en la secuencia de la proteína Bm86, polimerizada con cisteína en el N-terminal y en el C-terminal, **que consiste en** CLSKHVLRKQLQACEHSSICSDFGNEFCRNACDCGEWGAMNMTTRC, el cual, cuando se inocular en bovinos, **se caracteriza por** la producción de inmunidad contra garrapatas, reduciendo su número y su capacidad reproductiva.
- 10 2. Una vacuna sintética contra garrapatas que comprende el inmunógeno sintético SBm7462 (*Boophilus microplus* 7462 sintético), **que consiste en** una secuencia continua y definida con cuarenta y tres (43) aminoácidos que se encuentran en diferentes posiciones en la secuencia de la proteína Bm86, polimerizada con cisteína en el N-terminal y en el C-terminal, **que consiste en** CLSKHVLRKQLQACEHCDCGEWGAMNMTTRSSICSDFGNEFCRNAC, el cual, cuando se inocular en bovinos, **se caracteriza por** la producción de inmunidad contra garrapatas, reduciendo su número y su capacidad reproductiva.
- 15 3. Una composición medicamentosa de la vacuna sintética contra garrapatas definida en la reivindicación 1 ó 2, formada por el inmunógeno sintético SBm4912 o el SBm7462 más un adyuvante adecuado, en cualquier dosificación de la mezcla, para la producción de inmunidad contra garrapatas, reduciendo sus números y su capacidad reproductiva.

20

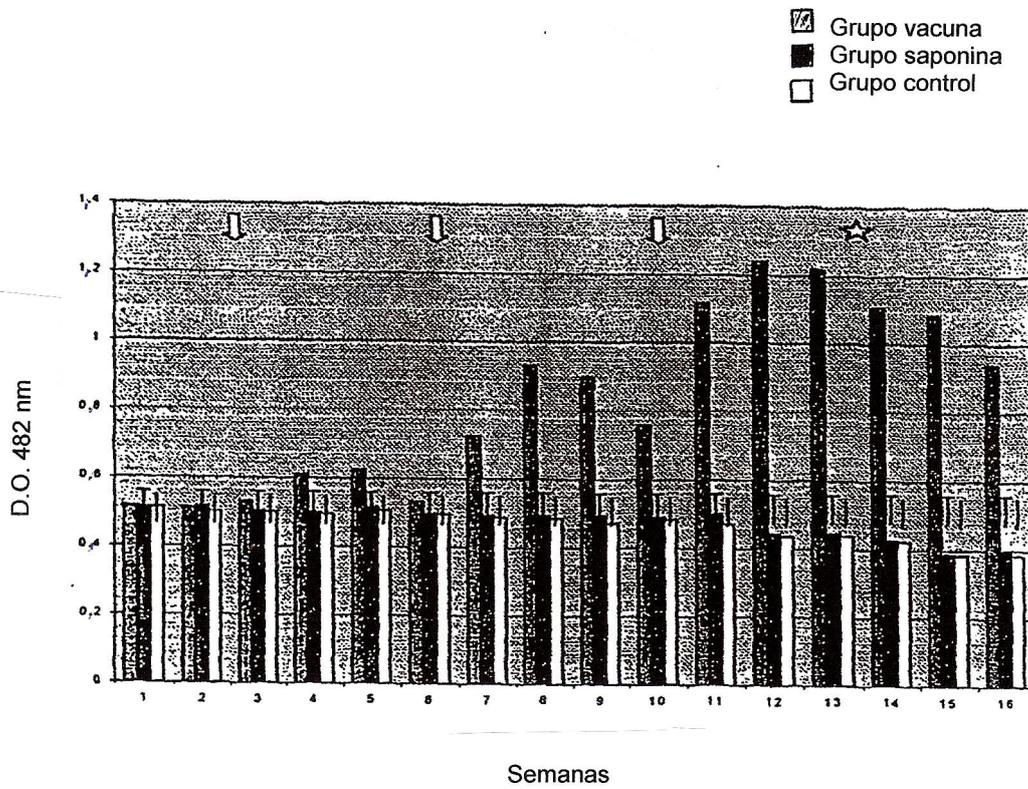
25

30



Cinéticas de anticuerpos en animales inmunizados mediante el péptido SBm4912. Las flechas indican inoculaciones y la estrella indica el tiempo de exposición con larvas de *Boophilus microplus*. Las barras T indican la diferencia por adición de dos desviaciones estándar.

FIGURA 1



Cinéticas de anticuerpos en animales inmunizados mediante el péptido SBm7462. Las flechas indican inoculaciones y la estrella indica el tiempo de exposición con larvas de *Boophilus microplus*. Las barras T indican la diferencia por adición de dos desviaciones estándar.

FIGURA 2

DOCUMENTOS CITADOS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de documentos citados por el solicitante se recoge sólo a modo de información para el lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha recopilado con mucho cuidado, la OEP rechaza toda responsabilidad respecto a posibles errores u omisiones.

5 Documentos que no son patentes citados en la descripción

- **BRANCO et al.** *Coletânea de Pesquisas EMRAPA/CNPO*, 1987, 229-234 [0003]
- **JONSSON et al.** *Veterinary Parasitology*, 1998, vol. 78, 66-77 [0003]
- **PATARROYO.** *Revista de Patologia Tropical*, 1994, vol. 23, 145-146 [0006]
- **HORN ; ATECHE.** *A Hora Veterinária*, 1985, vol. 4, 12-32 [0007]
- **HORN.** Programa nacional de controle de parasitoses. *Curso de Parasitologia Animal*, 1988, vol. 2, 21-42 [0007]
- **DAVIDSON, S.** *Rural Research*, 1985, vol. 128, 4-8 [0010]
- **OPDEBEECK et al.** *Immunology*, 1988, vol. 63, 363-367 [0010]
- **WILLADSEN et al.** *Journal of Immunology*, 1989, vol. 143, 1346-1351 [0011]
- **RAND et al.** *Proceedings of the National Academic Sciences USA*, 1989, vol. 86, 9657-9661 [0011]
- **SHARP et al.** *J. Chromatography*, 1990, vol. 512, 189-202 [0012]
- **GOUGH ; KEMP.** *Journal of Parasitology*, 1933, vol. 79, 900-907 [0013]
- **LEE ; OPDEBEECK.** *International Journal of Parasitology*, 1994, vol. 25, 241-248 [0013]
- **TELLAM et al.** *Animal Parasite Control Using Biotechnology*, 1992, 303-331 [0015]
- **TURNBULL et al.** *Applied Environmental Microbiology*, 1990, vol. 56, 2847-2852 [0015]
- **RODRIGUEZ et al.** *Journal of Biotechnology*, 1994, vol. 33, 135-146 [0016]
- **WILLADSEN et al.** *Veterinary Parasitology*, 1997, vol. 71, 209-222 [0017]
- **HOOP ; WOODS.** *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, 1981, vol. 78, 3824-3828 [0027]
- **CHOU ; FASMAN.** *Advances of Enzymology of Relative Areas in Molecular Biology*, 1978, vol. 47, 45-148 [0027]
- **KYTE ; DOOLITTLE.** *Journal of Molecular Biology*, 1982, vol. 157, 105-132 [0027]
- **MERRIFIELD.** *Journal of the American Chemistry Society*, 1963, vol. 85, 2149 [0028]
- **CALVO et al.** *Peptides Research*, 1991, vol. 4, 324-333 [0034]
- **OBA.** *Revista da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, 1976, vol. 13, 409-420 [0037]
- **MASSARD et al.** *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 1995, vol. 17, 167-173 [0037]
- **Habana.** *Elpos Scientiae*, 1995, 280 [0037]