



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE Nº **03-69234**

54 TÍTULO **UN NUEVO PRODUCTO PARA EL COMBATE DE GARRAPATAS Y EL PROCESO**
PARA LA PREPARACION

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **A01N 25/04, (07H1S/22**
AGIK 3/71

71 SOLICITANTE **CARLSON INTERNATIONAL INC.**

DOMICILIO **PANAMA PANAMA**

74 APODERADO **MAURICIO JARAMILLO**

22 BOGOTÁ, D C **AGOSTO DE 2003**

AS
OS

PETITORIO



03 069234 00

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN O DE MODELO DE UTILIDAD DE NUEVAS CREACIONES 2000-3

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 03069234 00000000

Folios. 50

Fecha (MM/DD): 2003-08-12 17:33:07

Trámite : 002 POTENTES D I REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Resolución: 2000 UJ/ST/02 DE NUEVAS CREACIONES 2000-3

①

SOLICITUD DE

☒ X

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre

CARLSON INTERNATIONAL INC

Dirección

AV BALBOA, EDIFICIO BALBOA

Teléfono

Fax

E-Mail

PANAMA, PANAMA

IDENTIFICACION

C.C

NIT

C.E

Otro

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre

MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO

Dirección

CRA. 9 No. 73 24 BOGOTA COLOMBIA

Teléfono

310 7055

Fax

310 6657

E-Mail

mjaramillo@gomezpinzon.com

IDENTIFICACION

C.C

NIT

C.E

Otro

Número

80.421 942 TP 74.555

④

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre

BRUCE ZBIG VAN AKEN WOLFF

Dirección

AVENIDA DAS AMERICAS 500, BLOCO 16,
LOJA 105

Teléfono

Fax

E-Mail

Domicilio

RIO DE JANEIRO BRASIL

IDENTIFICACION

C.C

NIT

C.E

Otro

Número

⑤

Título (54)

UN NUEVO PRODUCTO PARA EL COMBATE DE GARRAPATAS Y EL PROCESO PARA LA PREPARACION

⑥

Clasificación Internacional (51)

A01N 25/04, C07H 15/32, A61K 3/04

⑦

Prioridad

SI

☒ X

NO

☐

(33) País de Origen

URUGUAY

(32) Fecha

AGOSTO 12 2002

(31) Número de Solicitud

27412

⑧

Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los

6 meses

☐

12 meses

☐

18 meses

☒ X

Otro

☐

⑨

Comprobante de pago No

Fecha

AGOSTO DE 2003

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario ver reverso de esta página

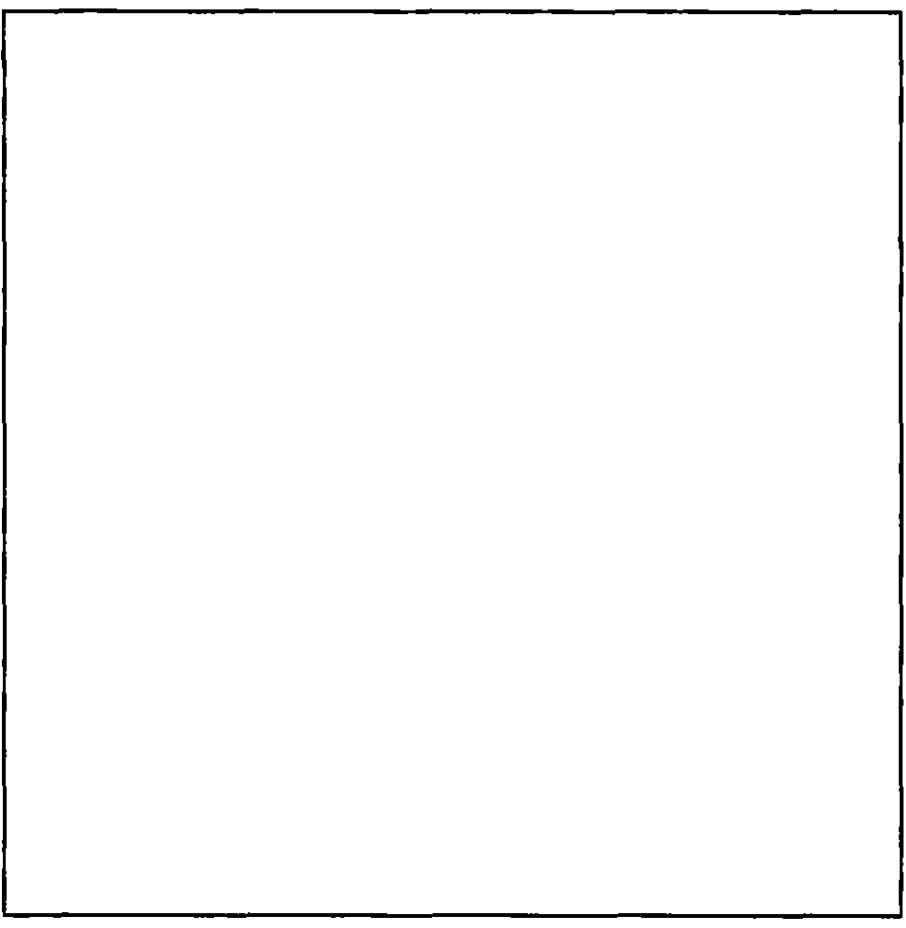
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Copia certificada de la primera solicitud si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o as causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☐ Dibujos y/o planos necesarios.
- ☐ De ser el caso copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

NOMBRE

MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO

FIRMA

C.C

80.421 942
USAQUÉN

T P

74 555 C.S.J

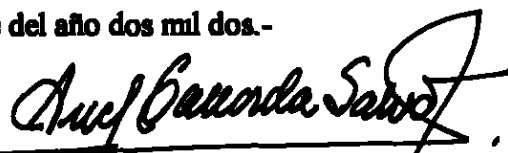


MINISTERIO DE INDUSTRIA ENERGIA Y
MINERIA

DIRECCION NACIONAL DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL
BOVARIAS PATENTES

LA DIRECCIÓN NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL CERTIFICA que con fecha 12 de agosto de 2002, se presentó bajo Acta N° 27 412 una solicitud de Patente de Invención a nombre de CARLSON INTERNATIONAL INC. de Panama, para lo denominado "UN NUEVO PRODUCTO PARA EL COMBATE DE GARRAPATAS Y EL PROCESO PARA LA PREPARACIÓN" cuya memoria descriptiva, reivindicaciones y dibujos, adjuntos, son copia fiel de la documentación depositada en esta Dirección A solicitud de parte interesada y atento a la adhesión de Uruguay a la Convención de París (Acta de Estocolmo, 1967) según Ley N° 14 910 de 19 de julio de 1979, se expide el presente, en la ciudad de Montevideo, Republica Oriental del Uruguay, el dieciocho de octubre del año dos mil dos.-

cl


Dr. Ariel Callorda Salvo
Director de la
Propiedad Industrial

TITULO. UN NUEV PRODUCTO PARA EL COMBATE DE GARRAPATAS Y EL PROCESO PARA LA PREPARACION

La presente invención se refiere a composiciones fármaco biológicas, más precisamente a un nuevo producto y su procedimiento para la fabricación, destinado al mercado vetennano para combatir las garrapatas en los rebaños bovinos de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, caracterizado porque su forma de acción se basa en un novedoso vehículo oleoso que permite solubilizar la primera Eprinomectina inyectable del mundo con antígenos específicos de garrapatas. Se trata de un endo y ectoparasitocida inyectable, con acción biológica contra las infestaciones de garrapatas. Mientras la Eprinomectina actúa con todo su potencial farmacéutico endectocida, los antígenos específicos van implementando una inmunidad gradual contra las garrapatas. Es por lo tanto, un agente endectocida de acción mixta, farmacéutica y biológica.

Antecedentes de la Invención

Sobre las Garrapatas y el Antígeno Protector

La garrapata *Boophilus microplus* es el ectoparásito más importante de los bovinos debido a su amplia distribución geográfica, ocurriendo en todas las regiones de clima tropical y subtropical del mundo, entre los paralelos 32° Sur y 40° Norte. La morbilidad y mortalidad son causadas por el hematofagismo y por los agentes patogénicos hemotrópicos que transmite, siendo este uno de los mayores problemas en la pecuana bovina (Hernández, 1997).

El método clásico de control de garrapatas, que preconiza el uso de acaricidas de forma sistemática, trae otros inconvenientes, además del uso de estos productos químicos que llevan al apareamiento de cepas resistentes. Siendo necesario un tratamiento continuo, la frecuencia de veces en que se necesita reunir el ganado, lleva a una reducción en rendimiento productivo del rebaño (Montero, pág. 6), sin considerar la toxicidad de los acaricidas, que afecta la salud de los animales, del Hombre y de la contaminación que producen en el



medio ambiente (Valle, pág 22) Entretanto, la utilización de esos productos ha sido la principal medida de control del *B microplus*, siendo que, desde la década de 50, la implantación de controles estratégicos sosteniendo la simulación de modelos de población ha tenido como objetivo el uso mínimo de productos químicos, de forma de evitar el desarrollo de cepas resistentes y mantener las poblaciones de garrapatas reducidas, sin quebrar la estabilidad inmunológica, frente a los agentes etiológicos de la tristeza parasitana (Hernández, 1997)

Las primeras señales de resistencia del *Boophilus microplus* a los arsenicales, fueron detectadas al final de la década de 30, en países de América del Sur, África y Australia. Otros principios activos (órganofosforados, carbamatos, piretroides y amidinas) fueron introducidos en el combate a las garrapatas en las décadas siguientes y siempre con el constante apareamiento de resistencia a estos productos químicos. Según la FAO, actualmente en más de 24 países, el *B microplus* presenta resistencia a acaricidas disponibles. En Cuba, la resistencia del *B microplus* a órganofosforados fue descripta por la primera vez en 1976 y actualmente también son resistentes a amidinas (Mano Valdéz, pág 9)

Algunos animales, después de reiteradas infestaciones por garrapatas, presentan una resistencia adquirida que varía de acuerdo a la raza bovina, pudiendo ser considerada como un método de control inmunológico natural, pero que generalmente es insuficiente para controlar las infestaciones

Las características predominantes del ganado existente en el Estado de Río de Janeiro, Brasil, que es constituido de cruas de ganado holandés y cebú, el que posee una inmunidad natural a las garrapatas intermediana entre el ganado europeo y asiático, es favorable para la utilización de la vacuna recombinante como medio de control de garrapatas (Valle, 2001)

Métodos alternativos de control de garrapatas han sido utilizados, tal como la introducción en los pastos de leguminosas capaces de matar a las larvas de las garrapatas, algunos otros métodos, tales como la utilización de garrapatas



machos estériles, obtenidos por cruza inter-especies (OSBURN & KNIPLING, 1982) y el control biológico utilizando predadores y microorganismos patogénicos (BRUM *et al.*, 1992, BITTENCOURT *et al.*, 1994) necesitan de una mejor evaluación técnico-científica para que sean refrendadas como medidas alternativas de control

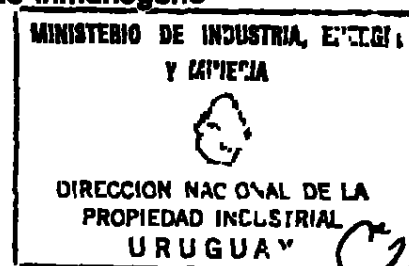
Los productos químicos acaricidas han sido utilizados como la principal medida para controlar el *B. microplus*. Estos producen algunas veces una mortalidad rápida y eficaz en las fases en que el parásito que se encuentra sobre el animal. Entretanto, su actividad sobre las larvas que están en el pasto es a veces limitada (MONTERO *et al.*, 2001)

Tales medidas aisladamente no trajeron mejoras que permitiesen disminuir los costos y las pérdidas en la pecuaria bovina. Paralelamente, no se pueden evitar los problemas de agresión al medio ambiente y de la resistencia cruzada en poblaciones de garrapatas que ocurren frecuentemente debido al uso empírico de estos productos (Hernández, 1997)

CARDOZO *et al.* (1994) evaluando los tratamientos acaricidas a base de avermectinas, aplicados vía *pour-on*, inyectable e intraruminal, elaboraron importantes comentarios sobre las formas de utilización del producto estudiado, afirmando que el uso indebido podrá hacerlos ineficaces

MONTERO *et al.* (2001) confirmaron que existe una gran limitación en el uso de productos químicos con relación al desarrollo de cepas de *B. microplus* resistentes. De tal forma, hay una relación entre el desarrollo de productos químicos para el control de garrapatas y el desarrollo de cepas resistentes a los mismos

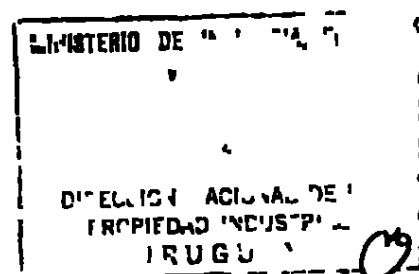
El comienzo de la alimentación de la garrapata sobre un animal que nunca fue expuesto a infestación por este parásito, es caracterizado por el reconocimiento de inmunógenos salivares por parte de células de la epidermis y de la dermis que se concentran en el lugar de la mordida. El tipo de inmunógeno



introducido difiere de acuerdo a la fase del ciclo biológico del parásito (Valle, 2001) Proteínas y otras moléculas inmunogénicas presentes en la saliva de la garrapata, pueden ser procesadas por células de Langerhans y macrófagos, o por células dendríticas, y finalmente son presentadas a los órganos linfáticos secundarios y a los linfocitos T. Los linfocitos T reconocen a los inmunógenos de la garrapata y los complejos de histocompatibilidad, en las células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T (helper 1 y helper 2) activados, liberarán linfocinas que funcionarán como inmuno-reguladores, permitiendo la generación de la respuesta mediada por células y anticuerpos (Mossman & Coffman, 1989). Los linfocitos T influyen todavía las reacciones de hipersensibilidad retardada, incluyendo la respuesta de hipersensibilidad cutánea por infiltración de basófilos que ocurre durante la alimentación de la garrapata (Willadsen, 1980, Dvorack et al., 1970). Inmunógenos, células presentadoras de antígenos, linfocitos T y citoquinas contribuyen para la activación de los linfocitos B, los cuales irán a producir los anticuerpos que actuarán contra las garrapatas. La respuesta primaria del parásito es inhibir la respuesta de hipersensibilidad y la reacción de los anticuerpos del hospedero, entretanto son necesarias mayores informaciones para entender la interacción de las defensas del hospedero con la garrapata (Valle, 2001).

La saliva de la garrapata cuando es introducida en la piel de un hospedero poco sensible, causa la desgranulación de mastocitos e basófilos, posiblemente mediante la hidrólisis enzimática, producida por enzimas salivares (Allen, 1979, Kemp & Bourne, 1980). Por lo tanto son liberados factores quimioestáticos y vaso activos que pueden contribuir con el pequeño influxo de leucocitos observado en los lugares de ligación de la garrapata en las primeras exposiciones del animal (Sauer, 1985). La formación de C5a, a partir de la vía alternativa del complemento, puede también contribuir con los influxos celulares en el local (Roberts & Kerr, 1976).

Las garrapatas pueden modular la respuesta natural y adquirida del hospedero, pues la saliva de este parásito posee inhibidores de la vía alternativa



del complemento, de anafilatoxinas y de células adhesinas. Además, la saliva reduce la formación de citoquinas por el macrófago, lo que es importante en la respuesta inicial contra la garrapata.

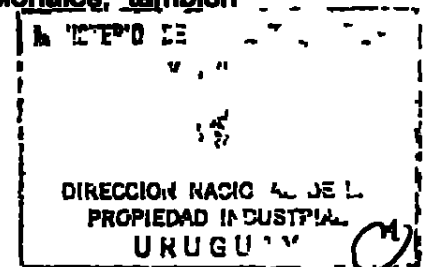
Las exposiciones repetidas al parásito, hacen que la garrapata entre en contacto con los elementos de la respuesta inmune del hospedero, luego los inmunógenos salivares estimulan la respuesta de memoria de los linfocitos T y B.

En animales resistentes, los basófilos e histaminas son atraídos al lugar de ligación de la garrapata con el hospedero, por mediadores y linfocitos T. Así, el complemento es activado por la vía alternativa o clásica, por la presencia del anticuerpo ligado al antígeno y los basófilos y mastocitos desgranulan cuando el complejo antígeno/anticuerpo ocupa el receptor celular.

En la inmunidad adquirida, los mecanismos específicos que interrumpen la alimentación y reducen la ovoposición, son poco conocidos.

Los antígenos relacionados con la inmunidad adquirida (natural), son normalmente aquellos presentes en las partes del parásito directamente ligadas al hospedero. Esa relación hace que, debido a las adaptaciones que ocurren en la evolución de la relación hospedero/parásito, muchas veces el uso de ese antígeno en la inmunización artificial, no sea eficiente. Durante los últimos años se viene buscando usar nuevos antígenos para inducir de forma artificial la inmunidad del hospedero. Estos antígenos, llamados "ocultos", no participan directamente en la interacción hospedero/parásito (Valle, 2001). Por ejemplo, Schlein & Lewis (1976) vacunaron conejos con tejido muscular de la mosca *Stomoxys calcitrans* y observaron que las mismas, después de la alimentación, presentaron lesiones musculares.

La primera sugerencia para la utilización de nuevos antígenos para inmunización de animales contra la garrapata, fue propuesta por Galun (1975). Las observaciones de GALUN indicaron la posibilidad de producir vacunas contra el *B. microplus* con el empleo de los nuevos antígenos funcionales, también



llamados antígenos ocultos, los cuales pueden ser clasificados como aquellas moléculas de importancia fisiológica para el parásito y que normalmente se encuentran ajenas a la interacción hospedero/parásito

Varios antígenos ocultos de *Boophilus microplus* fueron aislados, siendo el más conocido el Bm86, una glicoproteína de superficie de membrana de las células digestivas del intestino medio de hembras del *B. microplus*. La proteína Bm86, tiene peso molecular determinado en 89000 D y punto isoeléctrico entre 5,1 y 5,6 (Hernández, 1997)

RAND *et al* (1989), aislaron clones de cDNA relacionados con la glicoproteína Bm86, los cuales fueron purificados y homogeneizados

RODRIGUEZ *et al* (1994), empleando técnicas de radioinmunoensayo y cDNA-PCR, también aislaron y amplificaron el gene que codifica el antígeno Bm86 de *B. microplus*, expresándolo en varios sistemas, incluyendo la levadura meiotrófica *P. pastoris*. Esta expresión indujo un aumento en el potencial inmunogénico, pues la molécula es secretada en la forma glicosilada, originando partículas de 20-36 nm de diámetro, denominadas también de antígeno recombinante - rBm86. La proteína Bm86 tuvo su capacidad inmunogénica mantenida cuando se obtuvo por vía recombinante, posibilitando la producción de vacunas comerciales

La vacuna comercial fue entonces producida en gran escala, utilizándose la levadura - *P. pastoris* - en la cual se introdujo el gene codificante para la proteína Bm86 (Montero, pág 7)

La vacuna es capaz de inducir una respuesta inmunológica que permite mantener a los parásitos bajo control, teniendo una perspectiva de protección más prolongada, sin los problemas ambientales causados por los acaricidas químicos

El efecto sobre las garrapatas que parasitan a los bovinos vacunados, ha sido estudiado histológicamente, observándose una ruptura de las células



digestivas, seguida por una penetración de células del hospedero en la hemolinfa del parásito, sin observarse daño alguno en los tejidos salivares. La vacunación provoca lesiones expresivas al parásito durante la fase adulta, pero en las fases larvales, los daños no son tan importantes, generalmente llevando apenas a un retardo en el desarrollo de la ninfa (Valle, 2001)

Se sabe actualmente, que el sistema complemento tiene función esencial en la respuesta inmune que ocurre contra el antígeno de mucosa y es la causa de parte de las lesiones provocadas en el intestino de las garrapatas. La importancia de la participación del complemento en los eventos degenerativos en el intestino del parásito fue comprobada al verificarse que garrapatas alimentadas con suero bovino de animales vacunados, pero libres del complemento, no presentaron las lesiones características (Coons et al, 1988). Las células intestinales lesionadas por la vacuna, son las células digestivas, cuya función esencial es realizar la endocitosis y digestión intracelular de la sangre, que es el alimento fundamental de la garrapata (Hamilton et al, 1991)

El mecanismo de acción del antígeno vacunal Bm 86 en la garrapata, puede ser resumido de la siguiente manera: la sangre del animal vacunado, contiene altos niveles de anticuerpos y de otros elementos mediadores de la respuesta inmune, tal como el complemento. Cuando la sangre de este bovino vacunado es ingerida por la garrapata, los anticuerpos específicos se fijan al antígeno, y, en este caso a la superficie de las células digestivas del parásito, donde ocasiona severos daños morfo-fisiológicos. Las alteraciones morfológicas más frecuentemente observadas en garrapatas engurgitadas, sobre animales inmunizados son alteraciones en la conformación y en la coloración, el parásito se torna achatado y rojizo debido a la ruptura de la glándula accesoria de los órganos reproductores. Estos daños pueden ser observados por la reducción del número y del tamaño de las hembras alimentadas, reducción de la ovoposición y en la fertilidad de los huevos, lo que provoca la caída del potencial reproductor de las garrapatas en generaciones sucesivas y lleva a la disminución de las poblaciones en los pastos (COBON et al, 1995, RODRIGUEZ et al, 1995b)



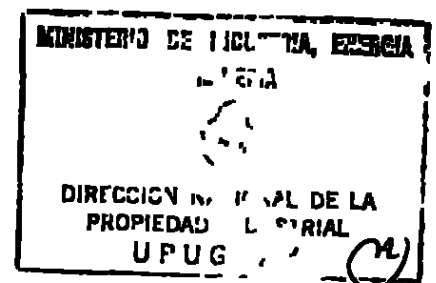
En experiencia realizada con ganado holandés y mestizo a campo, en prquetes, RODRIGUEZ *et al* (1995a) observaron reducción significativa del número de teleoginas sobre los hospederos, durante 36 semanas de desafío, concluyendo que el antígeno recombinado en *P pastons*, designado GAVAC™, puede ser indicado para controlar poblaciones de *B microplus* en generaciones sucesivas en los pastos

VANEGAS *et al* (1995), observaron que la inmunización sistemática de los bovinos, con antígenos vacunales rBm86, redujo el número de tratamientos acandidas en el rebaño, así como la incidencia de las hemoparasitosis

RODRIGUEZ *et al* (1995a) en prueba bajo condiciones controladas, usando rBm86 frente a dos cepas mejicanas de *B microplus*, Mora y Tuxpan, resistentes a garrapaticidas órganofosforados y piretroides, observaron la reducción del número de garrapatas sobre el hospedero, obteniendo eficacia de 56% a 58%, respectivamente Los autores señalaron que, al pnncipio, no observaron diferencias entre el número de garrapatas sobre los animales vacunados y de control, así como en la morfología y aspecto de estos, pero recién a partir de 48 y 58 días después de la pnmer dosis para la cepa Tuxpan y Mora, respectivamente

En prueba de establo, MASSARD *et al* (1995), obtuvieron resultados de 40% en la reducción del número de teleoginas en animales vacunados con relación al grupo de control Otros parámetros evaluados fueron reducción del peso de las hembras (6 2%), reducción en las posturas (8 0%) y reducción de la fertilidad de los huevos (10 0%) Considerando los diferentes índices verificados, la eficiencia integral de este antígeno frente a la cepa brasileña del *B microplus*, llegó a 51%

RODRIGUEZ *et al* (1995b), observaron que la vacuna redujo las infestaciones de garrapatas en los rebaños estudiados, no obstante haber habido



12

variación en la respuesta inmune de los animales a campo, dependiendo de la región, raza, individuo y factores climáticos

En trabajo realizado por Valle (2001) en Cuba, fue posible reducir el número de baños con garrapaticidas de 26 al año en 1997 para 2,5 al año en 2000. El mismo trabajo informa que el gasto con acaricidas fue reducido de 208 litros en el primer año (1997) para 22 litros en el último año de evaluación (2000).

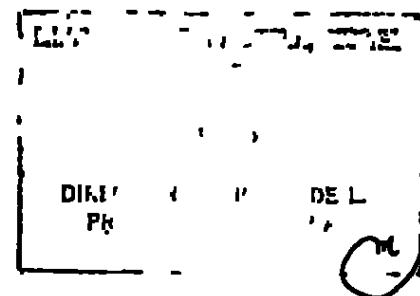
Un efecto importante observado a lo largo de todo el tratamiento experimental es la reducción significativa en la incidencia de Babesiosis (MONTERO *et al*, 2001).

Sobre la Eprinomectina

La Eprinomectina, la (4^R)-4^e-epi (Acetilamino)-4^e-deoxyavermectin B1, es un derivado semisintético de la familia de las avermectinas, procede de la fermentación de cepas de *Streptomyces avermectilis*, la estructura básica consiste de una lactona macrocíclica de 16 miembros, donde el C-17 y C-25 están fusionados a un grupo espiroacetal, el C-2 y el C-8 están fusionados a una unidad hexahidrofurano y en la posición C-13 contiene un azúcar, un disacárido (Raymond J Cvetovich, Dennis H Kelly, Lisa M DiMichele, Richard F Shuman and Edward J J Grabowski *Synthesis of 4^e-epi-Amino-4^e-deoxyavermectins B1* J Org Chem 1994, 59, 7704-7708).

La Eprinomectina es una mezcla de dos homólogos, eprinomectina B1a (90%) y eprinomectina B1b (10%) con la diferencia entre sí de un grupo metileno en el C-25.

Estas estructuras tienen un amplio espectro de actividad contra nematodos y artrópodos y su efectividad contra ambos endo y ecto parásitos ha llevado a denominarlas endectocidas. La Eprinomectina es una molécula endectocida de última generación.



El modo de acción farmacéutica de estas moléculas es aumentando la permeabilidad de las células musculares y nerviosas de los parásitos para los iones cloro, ocasionando la paralización y muerte de los mismos. La molécula se liga a los canales del cloro controlados por el glutamato, características de las células de invertebrados. También pueden asociarse a otros canales de cloro controlados por el GABA. Como los mamíferos no poseen este tipo de canal de cloro controlado por glutamato, estas lactonas macrocíclicas presentan un alto grado de seguridad, inclusive en dosis triplicadas.

Los productos a base de Eprinomectina presentes en el mercado, son de aplicación tópica, o sea, una solución de Eprinomectina al 0,5% p/v (0,5 g por 100 mL), es derramada sobre la piel del dorso del animal a la dosis de 0,5 mg/Kg de p v (0,1 mL/10 Kg de p v). Esta forma de aplicación es conocida como "pour-on".

La vía tópica o *pour-on* tiene algunas ventajas en lo que se refiere a la seguridad del aplicador, pero es también enormemente afectada por varias situaciones que pueden disminuir su eficacia por la imprecisión de su dosificación, como

- El pelaje del animal, el estado de la piel, la presencia de quemaduras, escaras u otros problemas pueden afectar la absorción cutánea del principio activo y así perjudicar su eficiencia como droga.
- Los factores ambientales, en áreas de seca donde los animales tienen muchas partículas de polvo en su dorso (frecuente en áreas de seca prolongada) o en el caso que los animales tengan su dorso sucio con barro o heces, la aplicación tópica sufre efectos adversos. En regiones tropicales o subtropicales, con cambios de clima súbitos y ante la eventualidad de lluvias torrenciales enseguida de las aplicaciones, pueden afectar la eficiencia de adsorción así como en días de fuerte irradiación solar donde el producto pueda cristalizar en el dorso del animal antes mismo que se inicie el proceso de absorción cutánea.



Todas estas condicionantes adversas toman obligatoria la necesidad de colocar cantidades de droga mayores que el doble de lo que sería necesario para combatir el parásito. Esta adición suplementaria tan elevada de principio activo tiene consecuencias económicas referentes al costo por animal tratado y podrá tener algún impacto ambiental en el medio ambiente rural.

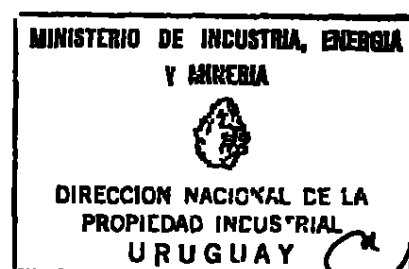
Durante la búsqueda de una molécula con acción endectocida y al mismo tiempo, que no sea eliminada por las grasas de la leche en los animales de producción, surgen una serie de estudios que culminan con la obtención de la Eprinomectina.

Primeramente, los trabajos de Shoop, Demontigny et al, en 1996, demostraron que las moléculas de avermectina/milbemycina, podían ser manipuladas para mejorar su acción o disminuir el coeficiente de partición (leche/plasma) en animales lecheros durante el período de producción.

Posteriormente se investigaron varias moléculas que presentaban el C-22,23 insaturado y finalmente aquellas con el C-4 epi-amino análogo insaturado en el C-22,23. Fue justamente este subgrupo que mostró los menores ratios de leche/plasma. La molécula fue denominada, por lo tanto, como 4-epi-acetilamino, 4-desoxy avermectin B1.

Alvinene et al, en 1999, concluyeron que solamente 0,1% de la droga aplicada fue eliminada en la leche. O sea, 50 veces menos si comparado con ivermectina o moxidectina.

Inicialmente lanzada en el mercado por la vía tópica a 500 ug/kg de peso vivo, la Eprinomectina, es ahora presentada, por primera vez, por la vía inyectable, subcutánea o intramuscular, gracias al desarrollo de un vehículo novedoso que además de promover mejoras a la farmacocinética y biodisponibilidad de la molécula, permite la asociación de dos antígenos específicos contra el *Boophilus microplus*.



La Eprinomectina actúa en la vía inyectable con más eficacia, presentando una biodisponibilidad mayor y así expresando toda su característica endectocida, actuando sobre gusanos redondos gastrointestinales y pulmonares, uras, piojos chupadores y masticadores, ácaros conópteros y sarcópteros, mosca de los cuernos y garrapatas

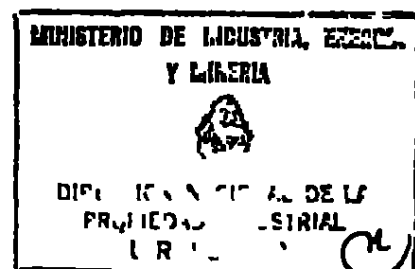
La acción mixta, farmacéutica y vacunal, determina que los animales permanezcan limpios de parásitos internos y externos (principalmente garrapatas) y, con el tiempo, va determinando en las sucesivas aplicaciones, una inmunidad protectora de implantación gradual que va a permitir un mayor intervalo entre tratamientos y una disminución drástica de las infestaciones de garrapatas

El espaciamiento de los tratamientos tendrá una expresiva disminución de la cantidad de droga necesaria, para garantizar el control

La adición de antígenos específicos, obtenidos a partir de proteínas intestinales de las garrapatas y secuenciadas por ingeniería genética en cepas de levaduras estandarizadas, adyuvadas en un vehículo inyectable especial, irá determinando gradualmente una inmunidad contra las garrapatas, permitiendo que en un plazo de 2 años se consiga un estatus típico de control, sin eliminación total de las mismas

Esta situación es la más deseable, porque resuelve los problemas de esta insidiosa infestación sin que los animales pierdan la pre-inmunización contra las enfermedades (babesiosis y anaplasmosis) transmitidas por las garrapatas. Este hecho permitirá el transporte y desplazamiento de animales tratados de áreas controladas a áreas endémicas no tratadas, sin peligro del apareamiento del "shock hemolítico"

El producto se destina al combate de parásitos internos y externos de los rebaños de cría y lecheros de las regiones tropicales y subtropicales del mundo que estén infestados con garrapatas



La Eprinomectina, ahora disuelta en un vehículo inyectable especial, tendrá una dosis de droga por kilo de peso vivo 50% menor a la fórmula original de utilización tópica

- Vía inyectable de 200 a 250 ug/kg de peso vivo
- Vía tópica 500 ug/kg de peso vivo

La molécula permite un período de descarte cero de la leche y de la carne de los animales tratados. También es una molécula que no afecta el medio ambiente, ya que el producto rápidamente se neutraliza en el suelo cuando se liga a las partículas.

Su eliminación ocurre fundamentalmente en las heces (85%) y comprobadamente no afecta a la flora de insectos y coleópteros que procesan estas heces en el suelo.

Sobre el novedoso vehículo Inyectable

El nuevo producto objeto de esta invención es el resultado del desarrollo de un novedoso vehículo inyectable que puede, al mismo tiempo, solubilizar dosis de hasta 0.5% a 3.5% de Eprinomectina y presentar 2 antígenos específicos que acaban produciendo en el animal inmunidad activa y gradual contra las garrapatas.

El vehículo inyectable especial es un aceite asociado a derivados de aminoalcoholes, ésteres y tensoactivos.

Los ésteres y tensoactivos permiten que la mezcla de Eprinomectina y de los antígenos contra garrapata se puedan mezclar con el aceite transformándose en una emulsión estable gracias al equilibrio hidrófilo-lipófilo de los diferentes componentes. El agregado de los aminoalcoholes le otorga a la emulsión



estabilidad termodinámica adicional a la temperatura de conservación (de +2°C a +4°C) del fármaco-biológico

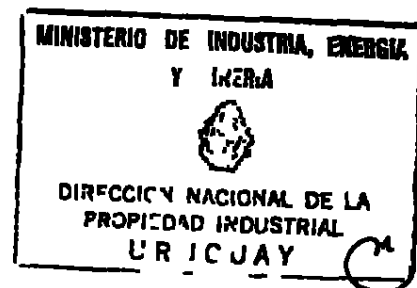
Esta invención provee de un vehículo cuya composición contiene los siguientes ingredientes

a) Matriz oleosa aceite mineral, vegetal o animal, altamente purificado, pudiendo este componente estar presente en la formulación a razón de 60 a 75% (porcentajes en peso por volumen p/v)

b) Un tensoactivo o mezcla de tensoactivos no iónicos tales como los ésteres de sorbitan, polioxietilenados o no, ésteres de alquilo polioxietilenados, los derivados polioxietilenados del aceite de ricino, los ésteres de poligliceroles, los alcoholes grasos polioxietilenados. Los tensoactivos deberán ser incorporados al aceite en cantidades tales que asegure una vez constituida la emulsión con la fase acuosa esta permanezca estable en el tiempo. Se propone que la mezcla de tensoactiva posea un HLB de 5.3 y se encuentre presente en la formulación en una concentración entre 9 y 12 % p/v (porcentajes en peso por volumen p/v)

d) Aditivo orgánico presente en la formulación para la mejora de la performance de la emulsión una vez elaborada. Para la selección de este ingrediente se realizaron experimentos senados donde se utilizaron distintas moléculas químicas entre las que se encontraron Trietanolamina, Alcohol bencílico, Acetona, Dimetilformamida, Monoetileter, Propilenglicol a partir de los cuales se elaboraron las diferentes emulsiones y luego se observó la estabilidad de la misma a dos temperaturas diferentes 37°C y 56°C. El aditivo orgánico prefendo fue la trietanolamina en un rango de concentración de 0.1 a 0.05% (porcentajes en peso por volumen p/v)

e) Un Antioxidante o mezcla de ellos, que puede ser el Butilhidroxianisol o Butilhidroxitolueno. Las concentraciones en las que aparecería en la formulación final respetarían las indicaciones de las Farmacopeas farmacéuticas o CFR 21



El vehículo CARACTERIZADO en el párrafo anterior le otorga al producto final las siguientes características inmunógenas

- ACCION DE CUERPOS QUE CONSITA EN EL SITIO DE INOCULACION LOS ELEMENTOS DE DEFENSA DE PRIMERA LINEA (PRINCIPALMENTE MACROFAGOS)
- ELUCION LENTA DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS (slow release)
- MIGRACION POR VIA LINFATICA CREANDO OTROS CENTROS DE REACCION EN EL SISTEMA RETICULO ENDOTELIAL

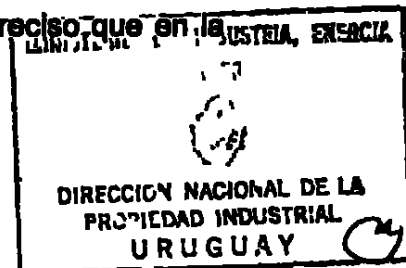
En la fórmula los principios activos el fármaco Eprinomectina y el biológico antígenos contra garrapata, inmersos en el vehículo se eluyen lentamente (slow release), de esa forma el efecto antiparasitario del fármaco se prolonga en el tiempo por su persistencia en sangre a través del tiempo (Larga Acción) y la implantación de la inmunidad es gradual y sostenida

La implantación de este tipo de inmunidad es muy compleja y lenta, es resultado del efecto "booster" de varias aplicaciones sucesivas

Luego de cada aplicación del nuevo producto el rebaño va aumentando progresivamente la inmunidad contra las garrapatas. Esta inmunidad resultante permite aumentar el espacio entre los tratamientos y reducir las poblaciones de garrapatas cada vez más. En resumen, la administración del nuevo producto disminuye la necesidad de los tratamientos y reduce el manejo estresante del rebaño.

Por último, a los efectos de evitar la transmisión de enfermedades iatrogénicamente, el nuevo producto vendrá acompañado de un peine de agujas de inyección para que se use una aguja por animal.

Este nuevo producto no se limita a presentar una Eprinomectina inyectable de mayor eficacia gracias al binomio dosis/efecto, mucho más preciso que en la



4- aplicación "pour-on", sino que al mismo tiempo que el producto elimina las garrapatas químicamente, va preparando el animal para dejarlo inmune a los parásitos

48
19

Esta invención proporciona un nuevo producto que se aplica por la vía inyectable siendo por lo tanto más segura. Su aplicación es más precisa y no es afectada por las inclemencias del tiempo (fuerte irradiación solar o lluvias torrenciales) después de la aplicación tópica. Al mismo tiempo que el hacendado elimina las garrapatas químicamente, él está dejando a su rebaño inmune y de esta forma, generando una situación de "control" donde las poblaciones de garrapatos disminuirán progresivamente hasta tomarse inocuas y no causando más pérdidas por depleción de sangre, transmisión de enfermedades o depreciación de cueros.

Sobre el proceso de formulación del producto

La invención también se refiere a un nuevo proceso para la fabricación del nuevo producto que comprende los siguientes pasos:

Fase Adyuvante - Temperatura de 50°C

● Filtración de aceite para esterilización

El aceite mineral es adicionado a los tensoactivos previamente termostatzados a 50° C. Toda la mezcla es homogeneizada a esa temperatura en tanques sanitarios absolutamente secos y sobre atmósfera de nitrógeno.

● Se inyecta a presión de nitrógeno al tanque de formulación y se somete el producto al proceso de filtración por cartuchos filtrantes clarificantes y esterilizantes con poro de 0.22 micras.

● El filtrado estéril será recibido en tanque de acero inoxidable 316, con electropulimento sanitario, previamente esterilizado, seco y con atmósfera de nitrógeno.



●Termostatar a 4°C – MEZCLA 1

Fase hidrosoluble - Temperatura de 4°C

●Los antígenos acuosos formados por las suspensiones de material recombinante de proteínas del sistema digestivo de la garrapata *Boophilus microplus* y obtenidos por fermentación bacteriana, son adicionados a la solución de Eprinomectina. La solución de Eprinomectina se prepara mediante la disolución del fármaco en un vehículo hidrosoluble en una concentración que puede ir desde 0.25% a 20% p/v (eprinomectina en vehículo hidrosoluble). La concentración de Eprinomectina en el producto final debe ser de 0.5% - 3.5% p/v y la dosis ha administrar del producto final debe ser de 200 a 250ug de eprinomectina/Kg de peso animal.

Una vez obtenida una suspensión homogénea, esta es lentamente colocada sobre fuerte agitación sobre la mezcla 1 de aceite y tenso activos a +4° C

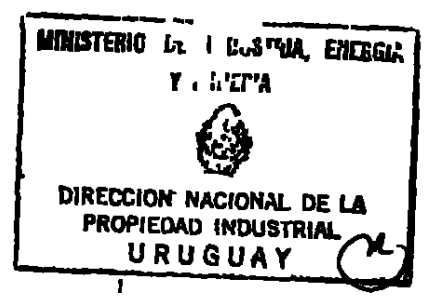
La pre-mezcla es agitada durante 2 horas para después ser homogeneizada por el pase en molinos coloidales o homogeneizador de alta presión del tipo GAULIN.

El producto terminado será mantenido a +4° C durante su periodo de vida útil y será envasado en frascos de tipo ampolla con tapa de goma nitrílica para profusión y con sello de aluminio.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Un objeto de la presente invención es presentar el principio activo Eprinomectina por la vía inyectable.

La Eprinomectina (4-epi-acetyl-amino-4-desoxy avermectin B₁) es una molécula de última generación de la clase de las lactosas macrocíclicas.



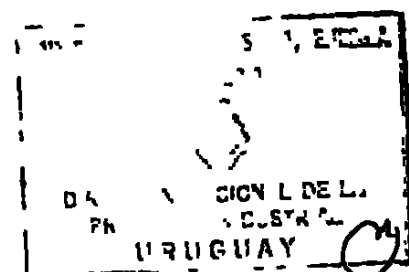
21-

Esta molécula ha sido inicialmente lanzada al mercado solamente por la vía tópica en una dosis de 500 µg/kg de peso vivo. La vía propuesta por este nuevo producto determina similar acción terapéutica en dosis muy inferiores 200-250 µg/kg de peso vivo.

Otro objeto de esta invención es unir en un mismo vehículo, el fármaco Eprinomectina y los antígenos específicos contra la garrapata (explicado anteriormente). De esta forma, el productor lechero o ganadero, al mismo tiempo que desparasita sus animales, va generando en su rebaño una inmunidad contra las garrapatas, que puede permanecer por un período de dos años.

Aun más, otro objeto de la invención es que el novedoso vehículo determina un efecto de liberación retardada de los principios activos, lo que va a determinar un mayor espacio de tiempo entre los tratamientos.

Un nuevo objeto de la invención es conseguir una disminución gradual de la cantidad de droga insecticida necesaria al combate de las garrapatas, influyendo drásticamente en todos los impactos ambientales que estos productos puedan causar.



REIVINDICACIONES

1 Un producto fármaco biológico o fármaco vacuna destinado al mercado veterinario para combatir las garrapatas en los rebaños bovinos de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, caracterizado porque su forma de acción se basa en un novedoso vehículo que permite solubilizar la primera, Eprinomectina inyectable del mundo, en dosis de 200-250 ug/kg de peso vivo, con antígenos específicos de garrapatas, más específicamente porque su acción principal es vehiculizar al mismo tiempo y por la vía inyectable, una lactona macrocíclica de última generación y antígenos contra las garrapatas

2 El producto de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado por ser el resultado del desarrollo de un novedoso vehículo inyectable que puede, al mismo tiempo, solubilizar dosis desde 0,5% a 3,5% de Eprinomectina y presentar 2 antígenos específicos que acaban produciendo en el animal inmunidad activa y gradual contra las garrapatas

3 El producto de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en donde el vehículo inyectable especial es un aceite que se asocia a ésteres y otros tensoactivos, donde estos tensoactivos permitirán que la solución de Eprinomectina se puedan mezclar con la solución acuosa contra las garrapatas, transformándose en una emulsión estable gracias al equilibrio hidrófilo-lipófilo de la emulsión a la temperatura de conservación del fármaco-biológico (+2 a +4° C)

4 El producto de acuerdo a la reivindicación 3, que contiene en su formulación un vehículo novedoso caracterizado por a) Una matriz oleosa constituida de aceite altamente purificado en la concentración de 60-75%p/v, b) Un tensoactivo o mezcla de dos de ellos tal que posea un HLB de 5 3 y que se encuentre presente en la formulación en una concentración entre 9 y 12 % p/v c) Un aditivo orgánico, trietanolamino (TEA) en la concentración de 0 1 a 0 05%p/v e) Un antioxidante o mezcla de ellos



27

5 El producto de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque contiene en su formulación un vehículo cuya matriz oleosa a) es un aceite de origen mineral

6 El producto de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque contiene en su formulación un vehículo cuya matriz oleosa a) es un aceite de origen vegetal

7 El producto de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque contiene en su formulación un vehículo cuya matriz oleosa a) es un aceite de origen animal

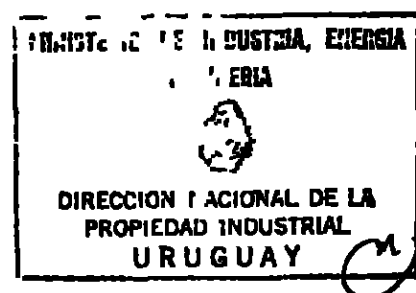
8 El producto de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque contiene en su formulación un vehículo cuyo tensoactivo b) puede ser elegido en el grupo de esteres de sorbitan, polioxietilenados o no, esteres de alquilo polioxietilenados, derivados polioxietilenados del aceite de ricino, esteres de poligliceroles y alcoholes grasos polioxietilenados

9 El producto de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque contiene en su formulación un vehículo cuyo antioxidante e) es el butilhidroxitolueno

10 El producto de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque contiene en su formulación un vehículo cuyo antioxidante e) es el butilhidroxianisol

11 El producto de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque contiene en su formulación un vehículo cuyo antioxidante e) es una mezcla de butilhidroxianisol y butilhidroxitolueno en la proporción (1 2)

10 El producto de acuerdo a la reivindicación 4, caracterizado porque el novedoso vehículo produce en el principio activo un efecto de liberación retardada, lo que va a determina un mayor espacio de tiempo entre los tratamientos



24

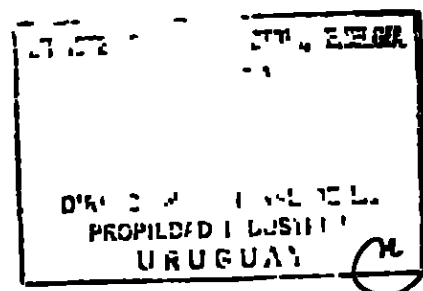
24

11 Un proceso para la preparación del producto, de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende dos fases, siendo la primera una fase a temperatura de 50° y la segunda una fase a temperatura de +4° C

12 Un proceso para la preparación del producto, de acuerdo a la reivindicación 11, donde la primera fase consiste en las siguientes etapas Filtración de aceite para esterilización, el aceite es adicionado a los agentes tensoactivos termostatzados a 50° C, donde toda la mezcla es homogeneizada a esa temperatura en tanques sanitarios absolutamente secos y sobre atmósfera de nitrógeno, donde bajo atmósfera de nitrógeno al tanque de formulación, se somete el producto al proceso de filtración por cartuchos filtrantes clarificantes y esterilizantes absolutos con poro de 0,22 milimicras, donde el filtrado estéril será recibido en tanque de acero inoxidable 316, con electro-pulimento sanitario, previamente esterilizado, seco y con atmósfera de nitrógeno

13 Un proceso para la preparación del producto, de acuerdo a la reivindicación 11, donde la segunda fase consiste en las siguientes etapas Los antígenos acuosos formados por las suspensiones de material recombinante de proteínas del sistema digestivo de la garrapata *Boophilus microplus* y obtenidos por fermentación bacteriana, son adicionados a la solución de Eprinomectina La solución de Eprinomectina se prepara mediante la disolución del fármaco en un vehículo hidrosoluble en una concentración que puede ir desde 0 25% a 20% p/v (eprinomectina en vehículo hidrosoluble) La concentración de Eprinomectina en el producto final puede ser de 0 5% a 3 5% p/v y la dosis ha administrar del producto final debe ser de 200 a 250ug de eprinomectina/Kg de peso animal, Una vez obtenida una suspensión homogénea, esta es lentamente colocada sobre fuerte agitación sobre la mezcla 1 de aceite y tenso activos a +4° C

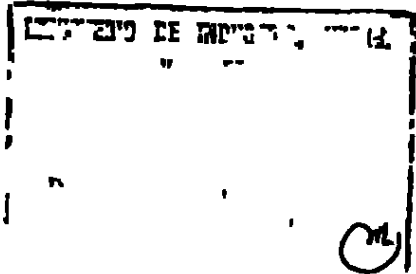
14 Un proceso para la preparación del producto, de acuerdo a la reivindicación 11, 12 y 13, donde la pre-mezcla es agitada durante 2 horas para después ser homogeneizada por el pase en molinos coloidales o homogeneizador de alta presión del tipo GAULIN, donde el producto terminado será mantenido a +4° C



25

durante su período de vida útil y será envasado en frascos de tipo ampolla con tapa de goma nitrílica para perfusión y con sello de aluminio

15 La invención como se ha descrito hasta aquí



RESUMEN DE LA INVENCION

Un objeto de la presente invención es presentar el principio activo Eprinomectina por la vía inyectable

La Eprinomectina (4-epi-acetilamino-4-desoxy avermectin B₁) es una molécula de última generación de la clase de las lactonas macrocíclicas

Esta molécula ha sido inicialmente lanzada al mercado solamente por la vía tópica en una dosis de 500 µg/kg de peso vivo. La vía propuesta por Eprinovax determina similar acción terapéutica en dosis muy inferiores 200-250 µg/kg de peso vivo

Otro objeto de esta invención es unir en un mismo vehículo, el fármaco Eprinomectina y los antígenos específicos contra la garrapata. De esta forma, el productor lechero o ganadero, al mismo tiempo que desparasita sus animales, va generando en su rebaño una inmunidad contra las garrapatas, que puede permanecer por un período de dos años

Aun más, otro objeto de la invención es que el novedoso vehículo determina un efecto de liberación retardada de los principios activos, lo que va a determinar un mayor espacio de tiempo entre los tratamientos

Un nuevo objeto de la invención es conseguir una disminución gradual de la cantidad de droga insecticida necesaria al combate de las garrapatas, influyendo drásticamente en todos los impactos ambientales que estos productos puedan causar

RESUMEN TÉCNIC

El objeto de invención de esta patente es un nuevo producto y su método de fabricación dirigido al mercado veterinario mundial, especialmente para aquellas regiones infestadas por garrapatas

Su acción principal es vehiculizar al mismo tiempo y por la vía inyectable, una lactona macrocíclica de última generación y un antígeno contra las garrapatas

Las ventajas principales del producto son las de disminuir la dosis de droga, gracias a la vía inyectable, sin ser afectada por los problemas de la vía tópica. Más aun, la droga pasa a ser liberada en un efecto retardado (*slow release*), distanciando las aplicaciones

Finalmente, el uso continuado del producto generará una inmunidad específica contra las garrapatas, controlando la plaga en el establecimiento

TITULO UN NUEVO PRODUCTO PARA EL COMBATE DE GARRAPATAS y el PROCESO PARA LA PREPARACION del PRODUCTO

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones fármaco biológicas, más precisamente a un nuevo producto y su procedimiento para la fabricación, destinado al mercado veterinario para combatir las garrapatas en los rebaños bovinos de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, caracterizado porque su forma de acción se basa en un novedoso vehículo oleoso que permite solubilizar la primera Eprinomectina inyectable del mundo con antígenos específicos de garrapatas. Se trata de un endo y ectoparasitocida inyectable, con acción biológica contra las infestaciones de garrapatas. Mientras la Eprinomectina actúa con todo su potencial farmacéutico endectocida, los antígenos específicos van implementando una inmunidad gradual contra las garrapatas. Es por lo tanto, un agente endectocida de acción mixta, farmacéutica y biológica.

Sobre las Garrapatas y el Antígeno Protector

La garrapata *Boophilus microplus* es el ectoparásito más importante de los bovinos debido a su amplia distribución geográfica, ocurriendo en todas las regiones de clima tropical y subtropical del mundo, entre los paralelos 32° Sur y 40° Norte. La morbilidad y mortalidad son causadas por el hematofagismo y por los agentes patogénicos hemotrópicos que transmite, siendo este uno de los mayores problemas en la pecuaria bovina (Hernández, 1997).

El método clásico de control de garrapatas, que preconiza el uso de acaricidas de forma sistemática, trae otros inconvenientes, además del uso de estos productos químicos que llevan al apareamiento de cepas resistentes. Siendo necesario un tratamiento continuo, la frecuencia de veces en que se necesita reunir el ganado, lleva a una reducción en rendimiento productivo del rebaño (Montero, pág. 6), sin considerar la toxicidad de los acaricidas, que afecta

la salud de los animales, del Hombre y de la contaminación que producen en el medio ambiente (Valle, pág 22) Entretanto, la utilización de esos productos ha sido la principal medida de control del *B microplus*, siendo que, desde la década de 50, la implantación de controles estratégicos sosteniendo la simulación de modelos de población ha tenido como objetivo el uso mínimo de productos químicos, de forma de evitar el desarrollo de cepas resistentes y mantener las poblaciones de garrapatas reducidas, sin quebrar la estabilidad inmunológica, frente a los agentes etiológicos de la tntesteza parasitana (Hernández, 1997)

Las pnmeras señales de resistencia del *Boophilus microplus* a los arsenicales, fueron detectadas al final de la década de 30, en países de Aménca del Sur, África y Australia Otros pnncipios activos (órganofosforados, carbarnatos, piretroides y amidinas) fueron introducidos en el combate a las garrapatas en las décadas siguientes y siempre con el constante aparecimiento de resistencia a estos productos químicos Segun la FAO, actualmente en más de 24 países, el *B microplus* presenta resistencia a acaricidas disponibles En Cuba, la resistencia del *B microplus* a órganofosforados fue descripta por la pnmera vez en 1976 y actualmente también son resistentes a amidinas (Mano Valdéz, pág 9)

Algunos animales, después de reiteradas infestaciones por garrapatas, presentan una resistencia adquinda que varía de acuerdo a la raza bovina, pudiendo ser considerada como un método de control inmunológico natural, pero que generalmente es insuficiente para controlar las infestaciones

Las características predominantes del ganado existente en el Estado de Rio de Janeiro, que es constituido de cruza de ganado holandés y cebu, el que posee una inmunidad natural a las garrapatas intermediana entre el ganado europeo y asiático, es favorable para la utilización de la vacuna recombinante como medio de control de garrapatas (Valle, 2001)

Métodos alternativos de control de garrapatas han sido utilizados, tal como la introducción en los pastos de leguminosas capaces de matar a las larvas de las

garrapatas, algunos otros métodos, tales como la utilización de garrapatas machos estériles, obtenidos por cruzas inter-especies (OSBURN & KNIPLING, 1982) y el control biológico utilizando predadores y microorganismos patogénicos (BRUM *et al*, 1992, BITTENCOURT *et al*, 1994) necesitan de una mejor evaluación técnico-científica para que sean refrendadas como medidas alternativas de control

Los productos químicos acaricidas han sido utilizados como la principal medida para controlar el *B. microplus*. Estos producen algunas veces una mortalidad rápida y eficaz en las fases en que el parásito que se encuentra sobre el animal. Entretanto, su actividad sobre las larvas que están en el pasto es a veces limitada (MONTERO *et al*, 2001)

Tales medidas aisladamente no trajeron mejoras que permitiesen disminuir los costos y las pérdidas en la pecuaria bovina. Paralelamente, no se pueden evitar los problemas de agresión al medio ambiente y de la resistencia cruzada en poblaciones de garrapatas que ocurre frecuentemente debido al uso empírico de estos productos (Hernández, 1997)

CARDOZO *et al* (1994) evaluando los tratamientos acaricidas a base de avermectinas, aplicados via *pour-on*, inyectable e intraruminal, elaboraron importantes comentarios sobre las formas de utilización del producto estudiado, afirmando que el uso indebido podrá hacerlos ineficaces

MONTERO *et al* (2001) confirmaron que existe una gran limitación en el uso de productos químicos con relación al desarrollo de cepas de *B. microplus* resistentes. De tal forma, hay una relación entre el desarrollo de productos químicos para el control de garrapatas y el desarrollo de cepas resistentes a los mismos

El comienzo de la alimentación de la garrapata sobre un animal que nunca fue expuesto a infestación por este parásito, es caracterizado por el reconocimiento de inmunógenos salivares por parte de células de la epidermis y

de la dermis que se concentran en el lugar de la mordida. El tipo de inmunógeno introducido difiere de acuerdo a la fase del ciclo biológico del parásito (Valle, 2001). Proteínas y otras moléculas inmunogénicas presentes en la saliva de la garrapata, pueden ser procesadas por células de Langerhans y macrófagos, o por células dendríticas, y finalmente son presentadas a los órganos linfáticos secundarios y a los linfocitos T. Los linfocitos T reconocen a los inmunógenos de la garrapata y los complejos de histocompatibilidad, en las células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T (helper 1 y helper 2) activados, liberarán linfocinas que funcionarán como immuno-reguladores, permitiendo la generación de la respuesta mediada por células y anticuerpos (Mossman & Coffman, 1989). Los linfocitos T influyen todavía las reacciones de hipersensibilidad retardada, incluyendo la respuesta de hipersensibilidad cutánea por infiltración de basófilos que ocurre durante la alimentación de la garrapata (Willadsen, 1980, Dvorack et al., 1970). Inmunógenos, células presentadoras de antígenos, linfocitos T y citoquinas contribuyen para la activación de los linfocitos B, los cuales irán a producir los anticuerpos que actuarán contra las garrapatas. La respuesta primaria del parásito es inhibir la respuesta de hipersensibilidad y la reacción de los anticuerpos del hospedero, entretanto son necesarias mayores informaciones para entender la interacción de las defensas del hospedero con la garrapata (Valle, 2001).

La saliva de la garrapata cuando es introducida en la piel de un hospedero poco sensible, causa la desgranulación de mastocitos e basófilos, posiblemente mediante la hidrólisis enzimática, producida por enzimas salivares (Allen, 1979, Kemp & Bourne, 1980). Por lo tanto son liberados factores quimioestáticos y vaso activos que pueden contribuir con el pequeño influxo de leucocitos observado en los lugares de ligación de la garrapata en las primeras exposiciones del animal (Sauer, 1995). La formación de C5a, a partir de la vía alternativa del complemento, puede también contribuir con los influxos celulares en el local (Roberts & Kerr, 1976).

Las garrapatas pueden modular la respuesta natural y adquirida del hospedero, pues la saliva de este parásito posee inhibidores de la vía alternativa del complemento, de anafilatoxinas y de células adhesinas. Además, la saliva reduce la formación de citoquinas por el macrófago, lo que es importante en la respuesta inicial contra la garrapata.

Las exposiciones repetidas al parásito, hacen que la garrapata entre en contacto con los elementos de la respuesta inmune del hospedero, luego los inmunógenos salivares estimulan la respuesta de memoria de los linfocitos T y B.

En animales resistentes, los basófilos e histaminas son atraídos al lugar de ligación de la garrapata con el hospedero, por mediadores y linfocitos T. Así, el complemento es activado por la vía alternativa o clásica, por la presencia del anticuerpo ligado al antígeno y los basófilos y mastócitos desgranulan cuando el complejo antígeno/anticuerpo ocupa el receptor celular.

En la inmunidad adquirida, los mecanismos específicos que interrumpen la alimentación y reducen la ovoposición, son poco conocidos.

Los antígenos relacionados con la inmunidad adquirida (natural), son normalmente aquellos presentes en las partes del parásito directamente ligadas al hospedero. Esa relación hace que, debido a las adaptaciones que ocurren en la evolución de la relación hospedero/parásito, muchas veces el uso de ese antígeno en la inmunización artificial, no sea eficiente. Durante los últimos años se viene buscando usar nuevos antígenos para inducir de forma artificial la inmunidad del hospedero. Estos antígenos, llamados "ocultos", no participan directamente en la interacción hospedero/parásito (Valle, 2001). Por ejemplo, Schlein & Lewis (1976) vacunaron conejos con tejido muscular de la mosca *Stomoxys calcitrans* y observaron que las mismas, después de la alimentación, presentaron lesiones musculares.

La primera sugerencia para la utilización de nuevos antígenos para inmunización de animales contra la garrapata, fue propuesta por Galun (1975).

Las observaciones de GALUN indicaron la posibilidad de producir vacunas contra el *B microplus* con el empleo de los nuevos antígenos funcionales, también llamados antígenos ocultos, los cuales pueden ser clasificados como aquellas moléculas de importancia fisiológica para el parásito y que normalmente se encuentran ajenas a la interacción hospedero/parásito

Varios antígenos ocultos de *Boophilus microplus* fueron aislados, siendo el más conocido el Bm86, una glicoproteína de superficie de membrana de las células digestivas del intestino medio de hembras del *B microplus*. La proteína Bm86, tiene peso molecular determinado en 89000 D y punto isoeléctrico entre 5,1 y 5,6 (Hernández, 1997)

RAND *et al* (1989), aislaron clones de cDNA relacionados con la glicoproteína Bm86, los cuales fueron purificados y homogeneizados

RODRIGUEZ *et al* (1994), empleando técnicas de radioinmunoensayo y cDNA-PCR, también aislaron y amplificaron el gene que codifica el antígeno Bm86 de *B microplus*, expresándolo en varios sistemas, incluyendo la levadura melitotrófica *P pastoris*. Esta expresión indujo un aumento en el potencial inmunogénico, pues la molécula es secretada en la forma glicosilada, originando partículas de 20-36 nm de diámetro, denominadas también de antígeno recombinante - rBm86. La proteína Bm86 tuvo su capacidad inmunogénica mantenida cuando se obtuvo por vía recombinante, posibilitando la producción de vacunas comerciales

La vacuna comercial fue entonces producida en gran escala, utilizándose la levadura – *P pastoris* – en la cual se introdujo el gene codificante para la proteína Bm86 (Montero, pág 7)

La vacuna es capaz de inducir una respuesta inmunológica que permite mantener a los parásitos bajo control, teniendo una perspectiva de protección más prolongada, sin los problemas ambientales causados por los acaricidas químicos

El efecto sobre las garrapatas que parasitan a los bovinos vacunados, ha sido estudiado histológicamente, observándose una ruptura de las células digestivas, seguida por una penetración de células del hospedero en la hemolinfa del parásito, sin observarse daño alguno en los tejidos salivares. La vacunación provoca lesiones expresivas al parásito durante la fase adulta, pero en las fases larvales, los daños no son tan importantes, generalmente llevando apenas a un retardo en el desarrollo de la ninfa (Valle, 2001)

Se sabe actualmente, que el sistema complemento tiene función esencial en la respuesta inmune que ocurre contra el antígeno de mucosa y es la causa de parte de las lesiones provocadas en el intestino de las garrapatas. La importancia de la participación del complemento en los eventos degenerativos en el intestino del parásito fue comprobada al verificarse que garrapatas alimentadas con suero bovino de animales vacunados, pero libres del complemento, no presentaron las lesiones características (Coons et al, 1988). Las células intestinales lesionadas por la vacuna, son las células digestivas, cuya función esencial es realizar la endocitosis y digestión intracelular de la sangre, que es el alimento fundamental de la garrapata (Hamilton et al, 1991)

El mecanismo de acción del antígeno vacunal Bm 86 en la garrapata, puede ser resumido de la siguiente manera: la sangre del animal vacunado, contiene altos niveles de anticuerpos y de otros elementos mediadores de la respuesta inmune, tal como el complemento. Cuando la sangre de este bovino vacunado es ingerida por la garrapata, los anticuerpos específicos se fijan al antígeno, y, en este caso a la superficie de las células digestivas del parásito, donde ocasiona severos daños morfo-fisiológicos. Las alteraciones morfológicas más frecuentemente observadas en garrapatas engurgitadas, sobre animales inmunizados son alteraciones en la conformación y en la coloración, el parásito se torna achatado y rojizo debido a la ruptura de la glándula accesoria de los órganos reproductores. Estos daños pueden ser observados por la reducción del número y del tamaño de las hembras alimentadas, reducción de la ovoposición y en la fertilidad de los huevos, lo que provoca la caída del potencial reproductor de las

garrapatas en generaciones sucesivas y lleva a la disminución de las poblaciones en los pastos (COBON *et al* , 1995, RODRIGUEZ *et al* , 1995b)

En experiencia realizada con ganado holandés y mestizo a campo, en prquetes, RODRIGUEZ *et al* (1995a) observaron reducción significativa del numero de teleoginas sobre los hospederos, durante 36 semanas de desafío, concluyendo que el antígeno recombinado en *P pastons*, designado GAVAC™, puede ser indicado para controlar poblaciones de *B microplus* en generaciones sucesivas en los pastos

VANEGAS *et al* (1995), observaron que la inmunización sistemática de los bovinos, con antígenos vacunales rBm86, redujo el numero de tratamientos acaricidas en el rebaño, así como la incidencia de las hemoparasitosis

RODRIGUEZ *et al* (1995a) en prueba bajo condiciones controladas, usando rBm86 frente a dos cepas mejicanas de *B microplus*, Mora y Tuxpan, resistentes a garrapaticidas órganofosforados y piretroides, observaron la reducción del numero de garrapatas sobre el hospedero, obteniendo eficacia de 56% a 58%, respectivamente Los autores señalaron que, al pncipio, no observaron diferencias entre el número de garrapatas sobre los animales vacunados y de control, así como en la morfología y aspecto de estos, pero recién a partir de 48 y 58 días después de la primer dosis para la cepa Tuxpan y Mora, respectivamente

En prueba de establo, MASSARD *et al* (1995a), obtuvieron resultados de 40% en la reducción del numero de teleoginas en animales vacunados con relación al grupo de control Otros parámetros evaluados fueron reducción del peso de las hembras (6 2%), reducción en las posturas (8 0%) y reducción de la fertilidad de los huevos (10 0%) Considerando los diferentes índices verificados, la eficiencia integral de este antígeno frente a la cepa brasileña del *B microplus*, llegó a 51%

RODRIGUEZ *et al* (1995b), observaron que la vacuna redujo las infestaciones de garrapatas en los rebaños estudiados, no obstante haber habido variación en la respuesta inmune de los animales a campo, dependiendo de la región, raza, individuo y factores climáticos

En trabajo realizado por Valle (2001) en Cuba, fue posible reducir el número de baños con garrapaticidas de 26 al año en 1997 para 2,5 al año en 2000. El mismo trabajo informa que el gasto con acaricidas fue reducido de 208 litros en el primer año (1997) para 22 litros en el último año de evaluación (2000)

Un efecto importante observado a lo largo de todo el tratamiento experimental es la reducción significativa en la incidencia de Babesiosis (MONTERO *et al*, 2001)

Sobre la Eprinomectina

La Eprinomectina, la (4'R)-4'-epi (Acetilamino)-4'-deoxyavermectin B1, es un derivado semisintético de la familia de las avermectinas, procede de la fermentación de cepas de *Streptomyces avermectilis*, la estructura básica consiste de una lactona macrocíclica de 16 miembros, donde el C-17 y C-25 están fusionados a un grupo espiroacetal, el C-2 y el C-8 están fusionados a una unidad hexahidrofurano y en la posición C-13 contiene un azúcar, un disacárido (Raymond J Cvetovich, Dennis H Kelly, Lisa M DiMichele, Richard F Shuman and Edward J J Grabowski *Synthesis of 4'-epi-Amino-4'-deoxyavermectins B1* *J Org Chem* 1994, 59, 7704-7708)

La Eprinomectina es una mezcla de dos homólogos, eprinomectina B1a (90%) y eprinomectina B1b (10%) con la diferencia entre sí de un grupo metileno en el C-25,

Estas estructuras tienen un amplio espectro de actividad contra nematodos y artrópodos y su efectividad contra ambos endo y ecto parásitos ha llevado a denominarlas endectocidas. La Eprinomectina es una molécula endectocida de última generación.

El modo de acción farmacéutica de estas moléculas es aumentando la permeabilidad de las células musculares y nerviosas de los parásitos para los iones cloro, ocasionando la paralización y muerte de los mismos. La molécula se liga a los canales del cloro controlados por el glutamato, características de las células de invertebrados. También pueden asociarse a otros canales de cloro controlados por el GABA. Como los mamíferos no poseen este tipo de canal de cloro controlado por glutamato, estas lactonas macrocíclicas presentan un alto grado de seguridad, inclusive en dosis triplicadas.

Los productos a base de Eprinomectina presentes en el mercado, son de aplicación tópica, o sea, una solución de Eprinomectina al 0,5% p/v (0,5 g por 100 mL), es derramada sobre la piel del dorso del animal a la dosis de 0,5 mg/Kg de p v (0,1 mL/10 Kg de p v). Esta forma de aplicación es conocida como "*pour-on*".

La vía tópica o *pour-on* tiene algunas ventajas en lo que se refiere a la seguridad del aplicador, pero es también enormemente afectada por varias situaciones que pueden disminuir su eficacia por la imprecisión de su dosificación, como

- El pelaje del animal, el estado de la piel, la presencia de quemaduras, escaras u otros problemas pueden afectar la absorción cutánea del principio activo y así perjudicar su eficiencia como droga.
- Los factores ambientales, en áreas de seca donde los animales tienen muchas partículas de polvo en su dorso (frecuente en áreas de seca prolongada) o en el caso que los animales tengan su dorso sucio con barro o heces, la aplicación tópica sufre efectos adversos. En regiones tropicales o subtropicales, con cambios de clima súbitos y ante la eventualidad de lluvias

torrenciales enseguida de las aplicaciones, pueden afectar la eficiencia de adsorción así como en días de fuerte irradiación solar donde el producto pueda cristalizar en el dorso del animal antes mismo que se inicie el proceso de absorción cutánea

Todas estas condicionantes adversas toman obligatoria la necesidad de colocar cantidades de droga mayores que el doble de lo que sería necesario para combatir el parásito. Esta adición suplementaria tan elevada de principio activo tiene consecuencias económicas referentes al costo por animal tratado y podrá tener algún impacto ambiental en el medio ambiente rural.

Durante la búsqueda de una molécula con acción endectocida y al mismo tiempo, que no sea eliminada por las grasas de la leche en los animales de producción, surgieron una serie de estudios que culminan con la obtención de la Eprinomectina.

Primeramente, los trabajos de Shoop, Demontigny et al, en 1996, demostraron que las moléculas de avermectina/milbemycin, podían ser manipuladas para mejorar su acción o disminuir el coeficiente de partición (leche/plasma) en animales lecheros durante el período de producción.

Posteriormente se investigaron varias moléculas que presentaban el C-22,23 insaturado y finalmente aquellas con el C-4 epi-amino análogo insaturado en el C-22,23. Fue justamente este subgrupo que mostró los menores ratios de leche/plasma. La molécula fue denominada, por lo tanto, como 4-epi-acetilamino, 4-desoxy avermectin B1.

Alvinene et al, en 1999, concluyeron que solamente 0,1% de la droga aplicada fue eliminada en la leche. O sea, 50 veces menos si comparado con ivermectina o moxidectina.

Inicialmente lanzada en el mercado por la vía tópica a 500 ug/kg de peso vivo, la Eprinomectina, es ahora presentada, por primera vez, por la vía inyectable,

subcutánea o intramuscular, gracias al desarrollo de un vehículo novedoso que además de promover mejoras a la farmacocinética y biodisponibilidad de la molécula, permite la asociación de dos antígenos específicos contra el *Boophilus microplus*

La Eprinomectina actúa en la vía inyectable con más eficacia, presentando una biodisponibilidad mayor y así expresando toda su característica endectocida, actuando sobre gusanos redondos gastrointestinales y pulmonares, uras, piojos chupadores y masticadores, ácaros conópteros y sarcópteros, mosca de los cuernos y garrapatas

La acción mixta, farmacéutica y vacunal, determina que los animales permanezcan limpios de parásitos internos y externos (principalmente garrapatas) y, con el tiempo, va determinando en las sucesivas aplicaciones, una inmunidad protectora de implantación gradual que va a permitir un mayor intervalo entre tratamientos y una disminución drástica de las infestaciones de garrapatas

El espaciamiento de los tratamientos tendrá una expresiva disminución de la cantidad de droga necesaria, para garantizar el control

La adición de antígenos específicos, obtenidos a partir de proteínas intestinales de las garrapatas y secuenciadas por ingeniería genética en cepas de levaduras estandarizadas, adyuvadas en un vehículo inyectable especial, irá determinando gradualmente una inmunidad contra las garrapatas, permitiendo que en un plazo de 2 años se consiga un estatus típico de control, sin eliminación total de las mismas

Esta situación es la más deseable, porque resuelve los problemas de esta insidiosa infestación sin que los animales pierdan la pre-inmunización contra las enfermedades (babesiosis y anaplasmosis) transmitidas por las garrapatas. Este hecho permitirá el transporte y desplazamiento de animales tratados de áreas controladas a áreas endémicas no tratadas, sin peligro del apareamiento del "shock hemolítico"

El producto se destina al combate de parásitos internos y externos de los rebaños de cna y lecheros de las regiones tropicales y subtropicales del mundo que estén infestados con garrapatas

La Eprinomectina, ahora disuelta en un vehículo inyectable especial, tendrá una dosis de droga por kilo de peso vivo 50% menor a la fórmula original de utilización tópica

- | | |
|-----------------|---------------------------------|
| •Vía inyectable | de 200 a 250 ug/kg de peso vivo |
| •Via tópica | 500 ug/kg de peso vivo |

La molécula permite un período de descarte cero de la leche y de la carne de los animales tratados. También es una molécula que no afecta el medio ambiente, ya que el producto rápidamente se neutraliza en el suelo cuando se liga a las partículas.

Su eliminación ocurre fundamentalmente en las heces (85%) y comprobadamente no afecta a la flora de insectos y coleópteros que procesan estas heces en el suelo.

Sobre el vehículo

El nuevo producto objeto de esta invención es el resultado del desarrollo de un novedoso vehículo inyectable que puede, al mismo tiempo, solubilizar dosis de hasta 0.5% a 3.5% de Eprinomectina y presentar 2 antígenos específicos que acaban produciendo en el animal inmunidad activa y gradual contra las garrapatas.

El vehículo inyectable especial es un aceite asociado a derivados de aminoalcoholes, ésteres y tensoactivos.

Los ésteres y tensoactivos permiten que la mezcla de Eprinomectina y de los antígenos contra garrapata se puedan mezclar con el aceite transformándose en una emulsión estable gracias al equilibrio hidrófilo-lipófilo de los diferentes componentes. El agregado de los aminoalcoholes le otorga a la emulsión estabilidad termodinámica adicional a la temperatura de conservación (de +2°C a +4°C) del fármaco-biológico.

Esta invención provee de un vehículo cuya composición contiene los siguientes ingredientes:

a) Matriz oleosa: aceite mineral, vegetal o animal, altamente purificado, pudiendo este componente estar presente en la formulación a razón de 60 a 75% (porcentajes en peso por volumen p/v).

b) Un tensoactivo o mezcla de tensoactivos no iónicos tales como los ésteres de sorbitan, polioxietilenados o no, ésteres de alquilo polioxietilenados, los derivados polioxietilenados del aceite de ricino, los ésteres de poliglicerol, los alcoholes grasos polioxietilenados. Los tensoactivos deberán ser incorporados al aceite en cantidades tales que asegure una vez constituida la emulsión con la fase acuosa esta permanezca estable en el tiempo. Se propone que la mezcla de tensoactiva posea un HLB de 5.3 y se encuentre presente en la formulación en una concentración entre 9 y 12 % p/v (porcentajes en peso por volumen p/v).

d) Aditivo orgánico presente en la formulación para la mejora de la performance de la emulsión una vez elaborada. Para la selección de este ingrediente se realizaron experimentos senados donde se utilizaron distintas moléculas químicas entre las que se encontraron: Tretanolamina, Alcohol bencílico, Acetona, Dimetilformamida, Monoetileter, Propilenglicol. A partir de los cuales se elaboraron las diferentes emulsiones y luego se observó la estabilidad de la misma a dos temperaturas diferentes: 37°C y 56°C. El aditivo orgánico preferido fue la tretanolamina en un rango de concentración de 0.1 a 0.05% (porcentajes en peso por volumen p/v).

e) Un Antioxidante o mezcla de ellos, que puede ser el Butilhidroxianisol o Butilhidroxitolueno. Las concentraciones en las que aparecería en la formulación final respetarían las indicaciones de las Farmacopeas farmacéuticas o CFR 21.

El vehículo CARACTERIZADO en el párrafo anterior le otorga al producto final las siguientes características inmunógenas:

- ACCIÓN DE CUERPOS QUE CONSISTA EN EL SITIO DE INOCULACIÓN LOS ELEMENTOS DE DEFENSA DE PRIMERA LÍNEA (PRINCIPALMENTE MACROFAGOS)
- ELUCIÓN LENTA DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS (slow release)
- MIGRACIÓN POR VÍA LINFÁTICA CREANDO OTROS CENTROS DE REACCIÓN EN EL SISTEMA RETÍCULO ENDOTELIAL

En la fórmula los principios activos, el fármaco Eprinomectina y el biológico antígenos contra garrapata, inmersos en el vehículo se eluyen lentamente (slow release), de esa forma el efecto antiparasitario del fármaco se prolonga en el tiempo por su persistencia en sangre a través del tiempo (Larga Acción) y la implantación de la inmunidad es gradual y sostenida.

La implantación de este tipo de inmunidad es muy compleja y lenta, es resultado del efecto "booster" de varias aplicaciones sucesivas.

Luego de cada aplicación del nuevo producto el rebaño va aumentando progresivamente la inmunidad contra las garrapatas. Esta inmunidad resultante permite aumentar el espacio entre los tratamientos y reducir las poblaciones de garrapatas cada vez más. En resumen, la administración del nuevo producto disminuye la necesidad de los tratamientos y reduce el manejo estresante del rebaño.

Por ultimo, a los efectos de evitar la transmisión de enfermedades iatrogénicamente, el nuevo producto vendrá acompañado de un peine de agujas de inyección para que se use una aguja por animal

Este nuevo producto no se limita a presentar una Eprinomectina inyectable de mayor eficacia gracias al binomio dosis/efecto, mucho más preciso que en la aplicación "pour-on", sino que al mismo tiempo que el producto elimina las garrapatas químicamente, va preparando el animal para dejarlo inmune a los parásitos

Esta Invención proporciona un nuevo producto que se aplica por la vía inyectable siendo por lo tanto más segura. Su aplicación es más precisa y no es afectada por las inclemencias del tiempo (fuerte irradiación solar o lluvias torrenciales) después de la aplicación tópica. Al mismo tiempo que el hacendado elimina las garrapatas químicamente, él está dejando a su rebaño inmune y de esta forma, generando una situación de "control" donde las poblaciones de garrapatos disminuirán progresivamente hasta tomarse inocuas y no causando más pérdidas por depleción de sangre, transmisión de enfermedades o depreciación de cueros.

Sobre el proceso de formulación del producto

La invención también se refiere a un nuevo proceso para la fabricación del nuevo producto que comprende los siguientes pasos:

Fase Adyuvante - Temperatura de 50°C

● Filtración de aceite para esterilización

● El aceite mineral es adicionado a los tensoactivos previamente termostatzados a 50° C. Toda la mezcla es homogeneizada a esa temperatura en tanques sanitarios absolutamente secos y sobre atmósfera de nitrógeno.

- Se inyecta a presión de nitrógeno al tanque de formulación y se somete el producto al proceso de filtración por cartuchos filtrantes clarificantes y esterilizantes con poro de 0.22 micras

El filtrado estéril será recibido en tanque de acero inoxidable 316, con electropulimento sanitario, previamente esterilizado, seco y con atmósfera de nitrógeno

- Termostatar a 4°C – MEZCLA 1

Fase hidrosoluble - Temperatura de 4°C

- Los antígenos acuosos formados por las suspensiones de material recombinante de proteínas del sistema digestivo de la garrapata *Boophilus microplus* y obtenidos por fermentación bacteriana, son adicionados a la solución de Eprinomectina. La solución de Eprinomectina se prepara mediante la disolución del fármaco en un vehículo hidrosoluble en una concentración que puede ir desde 0.25% a 20% p/v (eprinomectina en vehículo hidrosoluble). La concentración de Eprinomectina en el producto final debe ser de 0.5% - 3.5% p/v y la dosis a administrar del producto final debe ser de 200 a 250 µg de eprinomectina/Kg de peso animal.

Una vez obtenida una suspensión homogénea, esta es lentamente colocada sobre fuerte agitación sobre la mezcla 1 de aceite y tenso activos a +4°C

La pre-mezcla es agitada durante 2 horas para después ser homogeneizada por el pase en molinos coloidales o homogeneizador de alta presión del tipo GAULIN.

El producto terminado será mantenido a +4°C durante su período de vida útil y será envasado en frascos de tipo ampolla con tapa de goma nitrílica para profusión y con sello de aluminio.

REIVINDICACIONES

1 Un producto fármaco biológico o fármaco vacuna destinado al mercado veterinario para combatir las garrapatas en los rebaños bovinos de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, caracterizado porque su forma de acción se basa en un novedoso vehículo que permite solubilizar la primera, Eprinomectina inyectable del mundo, en dosis de 200-250 ug/kg de peso vivo, con antígenos específicos de garrapatas, más específicamente porque su acción principal es vehiculizar al mismo tiempo y por la vía inyectable, una lactona macrocíclica de última generación y antígenos contra las garrapatas

result

cl
clino
Componentes
y puros

2 El nuevo producto de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado por ser el resultado del desarrollo de un novedoso vehículo inyectable que puede, al mismo tiempo, solubilizar dosis desde 0,5% a 3,5% de Eprinomectina y presentar 2 antígenos específicos que acaban produciendo en el animal inmunidad activa y gradual contra las garrapatas

result

3 El producto de acuerdo con la reivindicación 1 y 2, en donde el vehículo inyectable especial es un aceite que se asocia a ésteres y otros tensoactivos, donde estos tensoactivos permitirán que la solución de Eprinomectina se puedan mezclar con la solución acuosa contra las garrapatas, transformándose en una emulsión estable gracias al equilibrio hidrófilo-lipófilo de la emulsión a la temperatura de conservación del fármaco-biológico (+2 a +4° C)

result.
ventajas
es el 1/1,

4 El producto de acuerdo a la invención contiene en su formulación un vehículo novedoso caracterizado por a) Una matriz oleosa constituida de aceite altamente purificado en la concentración de 60-75%p/v, b) Un tensoactivo o mezcla de dos

de ellos tal que posea un HLB de 5.3 y que se encuentre presente en la formulación en una concentración entre 9 y 12 % p/v c) Un aditivo orgánico, trietanolamino (TEA) en la concentración de 0.1 a 0.05%p/v e) Un antioxidante o mezcla de ellos

5 El producto de acuerdo con la reivindicación 4 contiene en su formulación un vehículo cuya matriz oleosa a) es un aceite de origen mineral ,

6 El producto de acuerdo con la reivindicación 4 contiene en su formulación un vehículo cuya matriz oleosa a) es un aceite de origen vegetal /

7 El producto de acuerdo con la reivindicación 4 contiene en su formulación un vehículo cuya matriz oleosa a) es un aceite de origen animal ~

8 El producto de acuerdo con la reivindicación 4 contiene en su formulación un vehículo cuyo tensoactivo b) puede ser elegido en el grupo de ésteres de sorbitan, polioxietilenados o no, ésteres de alquilo polioxietilenados, derivados polioxietilenados del aceite de ricino, ésteres de poligliceroles y alcoholes grasos polioxietilenados

9 El producto de acuerdo con la reivindicación 4 contiene en su formulación un vehículo cuyo antioxidante e) es el butilhidroxitolueno

10 El producto de acuerdo con la reivindicación 4 contiene en su formulación un vehículo cuyo antioxidante e) es el butilhidroxianisol

11 El producto de acuerdo con la reivindicación 4 contiene en su formulación un vehículo cuyo antioxidante e) es una mezcla de butilhidroxianisol y butilhidroxitolueno en la proporción (1/2)

a 8

12 Un proceso para la preparación del producto, de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende dos fases, siendo la primera una fase a temperatura de 50° y la segunda una fase a temperatura de +4° C

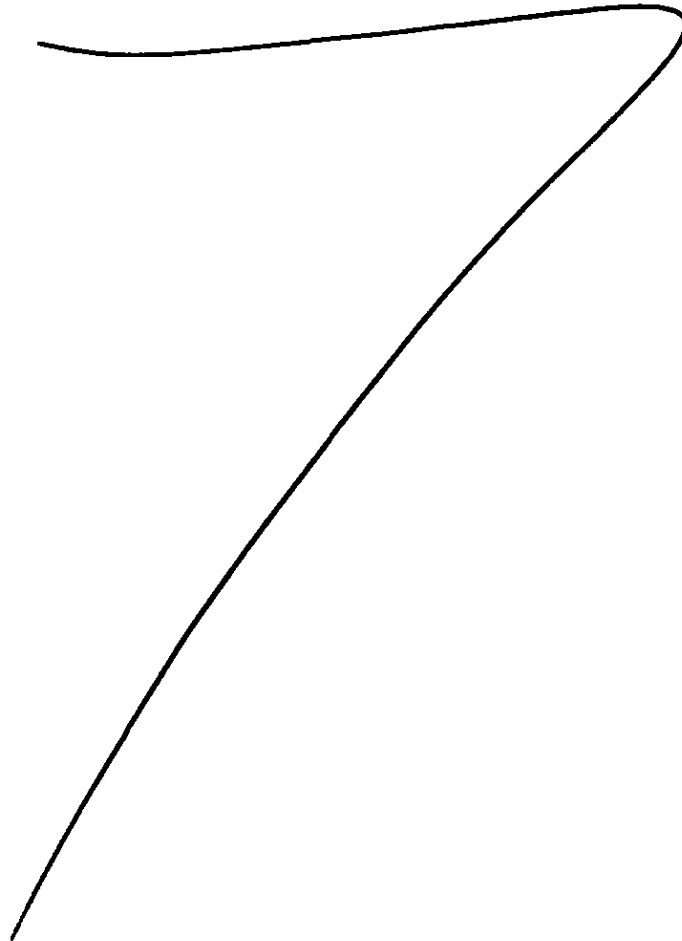
incompleto
y no
dado.

13 Un proceso para la preparación del producto, de acuerdo a la reivindicación 12, donde la primera fase consiste en las siguientes etapas Filtración de aceite para esterilización, el aceite es adicionado a los agentes tensoactivos termostatzados a 50° C, donde toda la mezcla es homogeneizada a esa temperatura en tanques sanitarios absolutamente secos y sobre atmósfera de nitrógeno, donde bajo atmósfera de nitrógeno al tanque de formulación, se somete el producto al proceso de filtración por cartuchos filtrantes clarificantes y esterilizantes absolutos con poro de 0,22 milimicras, donde el filtrado estéril será recibido en tanque de acero inoxidable 316, con electro-pulimento sanitario, previamente esterilizado, seco y con atmósfera de nitrógeno

definir
de acuerdo
a lo que se
dijo en
la reivindicación

14 Un proceso para la preparación del producto, de acuerdo a la reivindicación 12, donde la segunda fase consiste en las siguientes etapas Los antígenos acuosos formados por las suspensiones de material recombinante de proteínas del sistema digestivo de la garrapata *Boophilus microplus* y obtenidos por fermentación bacteriana, son adicionados a la solución de Eprinomectina La solución de Eprinomectina se prepara mediante la disolución del fármaco en un vehículo hidrosoluble en una concentración que puede ir desde 0 25% a 20% p/v (eprinomectina en vehículo hidrosoluble) La concentración de Eprinomectina en el producto final puede ser de 0 5% a 3 5% p/v y la dosis ha administrar del producto final debe ser de 200 a 250ug de eprinomectina/Kg de peso animal Una vez obtenida una suspensión homogénea, esta es lentamente colocada sobre fuerte agitación sobre la mezcla 1 de aceite y tenso activos a +4° C

15 Un proceso para la preparación del producto, de acuerdo a la reivindicación 12, 13 y 14, donde la pre-mezcla es agitada durante 2 horas para después ser homogeneizada por el pase en molinos coloidales o homogeneizador de alta presión del tipo GAULIN, donde el producto terminado será mantenido a $+4^{\circ}\text{C}$ durante su período de vida útil y será envasado en frascos de tipo ampolla con tapa de goma nitrílica para perfusión y con sello de aluminio



49

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 03069234 00000000 Folios. 50
Fecha (AMB): 2003-08-12 17:32:07
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO 411 PRESENTAC
Brasenderías PAGO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA 03 - 56,801
FECHA AGOSTO 12 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
GOMEZ PINZON Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	8731535	11/08/2003	112 000 00
GOMEZ PINZON Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	8731537	11/08/2003	4 ,000 00
GOMEZ PINZON Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	10695451	04/08/2003	212 000
GOMEZ PINZON Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	10695468	12/08/2003	212,000 00

***** C O N C E P T O *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL DE PATENTE DE IN	400 000 00
		TOTAL :	\$ 400,000 00

SOM: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

50

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 03069234 00000000
Fecha (AMB) 2003-08-12 17:33:07
Tramite 002 PATENTES D I REGISTRADO / III PRESENTAC
Remedios: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
NIT 0001764

RECIBO OFICIAL DE CAJA 03 - 56,802
FECHA AGOSTO 12 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
GOMEZ PINZON Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	8731535	11/08/2003	112 000 00
GOMEZ PINZON Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	8731537	11/08/2003	400,000 00
GOMEZ PINZON Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	10695451	04/08/2003	212 000
GOMEZ PINZON Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	10695468	12/08/2003	212,000

***** CONCEPTO *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN MU	112 000 00
		TOTAL	\$ 112,000

SON: CIENTO DOCE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL
TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ✓	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente	✓	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	✓	()
- Descripción de la invención	✓	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	✓	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas		
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable 

Fecha

Folio 52

2020
Bogotá, D. C.

Doctor(a)
MAURICIO JARAMILLO CAMPUZANO

Oficio No

7439

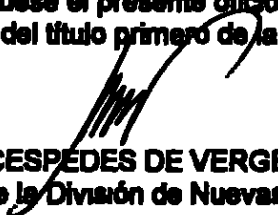
REFERENCIA.	Radicación	03-69234
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Allegar copia del documento en que conste la cesión del derecho a la patente otorgado por el(los) inventor(es) al(los) solicitante(s) o a su(s) causante(s) (art. 28-k, Dec 486/2000)
- Debe indicarse el lugar de constitución de la(s) sociedad(es) solicitante(s) (Art. 27-c, D 486/00)
- Debe allegar el(los) poder(es) otorgado(s) al abogado que aparece en la solicitud como apoderado, con el lleno de los requisitos exigidos en el Código de Procedimiento Civil. Cuando se requiera debe allegarse la sustitución del poder, otorgada por quien aparece como apoderado principal. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la(s) sociedad(es) solicitante(s)
- Se sugiere que para próximas actuaciones ante esta entidad sean utilizados los formatos actualizados establecidos en la circular única

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.


ALIX CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

11 SET 2003

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____

202027

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax. 350 5220
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C. Colombia