

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 083**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/08** (2006.01)

**A61K 31/429** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**A61P 33/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2009 E 09839765 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2376113**

54 Título: **Composiciones y regímenes de dosificación que comprenden una vacuna clostridial y levamisol**

30 Prioridad:

**24.12.2008 NZ 57401808**

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

**04.12.2014**

73 Titular/es:

**BAYER NEW ZEALAND LIMITED (100.0%)  
KPMG Centre, Level 12, 85 Alexandra Street  
Hamilton 3204 , NZ**

72 Inventor/es:

**LEECH, WAYNE, FREDERICK**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 524 083 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

Composiciones y regímenes de dosificación que comprenden una vacuna clostridial y levamisol

### **Declaración de la solicitud correspondiente**

5 La presente solicitud se basa en la memoria descriptiva provisional presentada en relación con la solicitud de patente de Nueva Zelanda número 574018, cuyo contenido completo se incorpora al presente documento por referencia.

### **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición y a un régimen de dosificación mejorados.

### **Técnica antecedente**

10 Las vacunas se usan amplia y frecuentemente, particularmente en veterinaria y en granjas industriales, con un gran número de vacunaciones para diversas enfermedades y otros problemas que aparecen relacionados con la salud.

En la industria sanitaria animal en concreto, el uso de vacunas para proteger frente a enfermedades clostridiales es muy utilizado.

15 Los efectos adversos para el bienestar de los animales pueden dar como resultado una reducción en el rendimiento y en la correspondiente venta (ya sea en términos del animal vivo, la carne o la lana) para el propietario. La pérdida de ganancias puede ser considerable y, por tanto, mantener a los animales sanos es de vital importancia para los granjeros/propietarios de animales.

20 Las preparaciones antihelmínticas son también ampliamente conocidas y utilizadas en la industria sanitaria animal para el tratamiento de la helmintiasis. Uno de dichos antihelmínticos es levamisol, el isómero levorotatorio de tetramisol. Se sabe que levamisol es un antihelmíntico particularmente eficaz en animales rumiantes cuando se administra a un nivel de dosificación de aproximadamente 7,5 mg por kg de peso corporal animal. Las dosificaciones que son demasiado bajas (menos de 6 mg por kg de peso corporal) son ineficaces en el tratamiento de la helmintiasis y pueden dar lugar a resistencia en los animales, y se ha demostrado que las dosificaciones altas tienen un efecto tóxico sobre los animales. Se divulgó la combinación de una vacuna con levamisol en primer lugar en el documento GB 2030043 (1979). Esta patente describe una composición inyectable ácida para el tratamiento de la helmintiasis y la prevención de enfermedades clostridiales en animales que comprende una vacuna en combinación con tetramisol o levamisol, sin indicar restricciones sobre las dosis eficaces.

25 El documento GB 2050830 (1980) divulga una vacuna en combinación con levamisol para su uso en la mejora de la respuesta de un animal rumiante a la vacuna. El documento GB 2050830 divulga también que cuando se presenta levamisol en combinación con una vacuna, se administra preferentemente a una velocidad de dosificación de aproximadamente 10 a 17 mg por kg de peso corporal del animal.

30 Siguiendo lo indicado en la patente citada, Schering Plough ha comercializado una combinación de una composición de una vacuna con levamisol para ovejas conocida como Nilvax™.

35 Nilvax™ se utiliza ampliamente en la industria sanitaria animal y se comercializa para el tratamiento de corderos de 20 kilogramos y más e incluso de ovejas de hasta 105 kilogramos. Nilvax™ proporciona una composición que contiene levamisol y una vacuna, estando levamisol presente a un 6,8 % de levamisol en forma de base libre (equivalente a 10 % de fosfato de levamisol). El régimen de dosificación recomendado para Nilvax™ proporciona a los animales una dosis de levamisol base comprendida entre 17,5 mg por kg para el animal de ensayo menos pesado a 3,78 mg por kg para el animal más pesado de 105 kg.

40 Utilizando estas dosificaciones sugeridas, la cantidad de levamisol que se administra al animal varía ampliamente, dando como resultado niveles potencialmente tóxicos y niveles ineficaces de levamisol para los animales más pesados. Esta variación en las dosificaciones puede ser potencialmente perjudicial para los animales y posteriormente puede dar como resultado pérdidas de ganado para el granjero. La dosificación en exceso de levamisol puede dar como resultado toxicidad para el animal y la dosificación en defecto puede ser ineficaz para el tratamiento de la helmintiasis y puede aumentar también el riesgo de que el animal desarrolle resistencia al fármaco.

45 El inventor ha mostrado también que composiciones conocidas de vacuna y levamisol que no aumentan significativamente los niveles de anticuerpos en los animales para todos los antígenos de la vacuna. En Nilvax™, por ejemplo, la cantidad de levamisol administrada junto con la vacuna fluctúa ampliamente dependiendo del peso del animal. Por tanto, cualquier mejora en la respuesta a la vacuna que se pueda atribuir a la presencia de levamisol no está maximizada, dado que no se proporciona una cantidad consistente de levamisol a todos los animales en un intervalo de pesos cuando se utilizan regímenes de dosificación y composiciones conocidas. Es por tanto un objeto de la presente invención proporcionar una composición y un régimen de dosificación mejorados que superen los anteriores problemas o proporcionen al usuario una elección útil.

5 Todas las referencias, incluyendo cualquiera de las patentes y de las solicitudes de patentes citadas en la presente memoria descriptiva se incorporan por la presente por referencia. No se reconoce que ninguna referencia constituya técnica anterior. La discusión de las referencias indica lo que sus autores afirman, y los solicitantes se reservan el derecho a cuestionar la fiabilidad y la pertinencia de los documentos citados. Se entenderá claramente que, aunque numerosas publicaciones de la técnica anterior se citan en el presente documento, esta referencia no constituye un reconocimiento de que cualquiera de estos documentos forma parte del conocimiento general común en la materia, en Nueva Zelanda o en cualquier otro país.

10 Se reconoce que el término 'comprende' puede, en diferentes jurisdicciones, tener cualquiera de un significado exclusivo o un significado inclusivo. Para los fines de la presente memoria descriptiva, y a no ser que se señale otra cosa, el término 'comprende' debe tener un significado inclusivo -es decir, que se considera que significa una inclusión no solo de los componentes relacionados que cita directamente, sino también de otros componentes o elementos no especificados. Se utilizará también esta lógica cuando el término 'comprendido' o 'que comprende' se usa en relación con una o más etapas en un procedimiento o procedimiento.

15 Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción que se proporciona solamente a modo de ejemplo.

**Divulgación de la invención**

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición que incluye 10-15 % en p/v de levamisol base y una vacuna clostridial.

20 Se divulga además un procedimiento de tratar animales, caracterizado por la etapa de administrar al animal una composición que incluye 10-15 % en p/v de levamisol base y una vacuna clostridial, y el animal que se va a tratar puede ser un rumiante.

Se divulga además que la composición se administra a un animal que lo necesita de acuerdo con el siguiente régimen de dosificación:

<b>Peso del animal</b>	<b>Cantidad</b>
36 45 kg	1,8 - 2,2 ml
46 - 55 kg	2,3 - 2,7 ml
56 - 65 kg	2,8 - 3,2 ml
66 - 75 kg	3,3 - 3,7 ml
76 - 85 kg	3,8 - 4,2 ml
86 -95 kg	4,3 - 4,7 ml
96 - 105 kg	4,8 - 5,2 ml
106 kg +	5,3 - 5,9 ml

25 o incluso de forma más preferente, la composición se administra al animal de acuerdo con el siguiente régimen de dosificación:

36-45 kg - 2,0 ml

46-55 kg - 2,5 ml

56-65 kg - 3,0 ml

66-75 kg - 3,5 ml

30 76 - 85 - 4,0 ml; y

0,5 ml por 10 kg de peso corporal para animales de más de 85 kg.

35 Este régimen de dosificación se ha desarrollado específicamente para proporcionar la dosificación más eficaz y eficiente de vacuna y levamisol. Se ha adaptado este régimen de dosificación para que se pueda administrar con facilidad a gran número de animales sin necesidad de realizar cambios de dosificación pequeños para cambios relativamente pequeños en el peso del animal. Se describe también un conjunto de instrucciones, en el que las instrucciones incluyen un régimen de dosificación para la administración de una composición que incluye al menos un 8 % en p/v de levamisol base y una vacuna clostridial.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, se debe considerar que el término 'levamisol' significa fosfato de levamisol, clorhidrato de levamisol, o cualquier otra forma activa de levamisol. Se debe considerar que el término

'levamisol base' significa la cantidad de levamisol libre en la composición.

Levamisol es la forma levo activa de tetramisol, y se usa comúnmente como antihelmíntico en el tratamiento de nematodos, por ejemplo, lombrices estomacales: *Haemonchus spp*, *Ostertagia spp*, *Trichostrongylus spp* y lombrices intestinales: *Trichostrongylus spp*, *Cooperia spp*, *Nematodirus spp*, *Bunostomum spp*, *Oesophagostomum spp*, *Chabertia spp*, particularmente en aplicaciones veterinarias. Se sabe también que levamisol mejora la eficacia de las vacunas cuando se administra simultáneamente.

En una realización preferida, el levamisol utilizado es fosfato de levamisol. De forma más preferente, la cantidad de fosfato de levamisol en la composición es de 220 mg/ml, que es equivalente a levamisol al 14,9 % como base libre, y de fosfato de levamisol al 22 %.

Se hará referencia en lo sucesivo de la presente memoria descriptiva en el presente documento a levamisol.

Tal como se muestra por los resultados de los ensayos animales reseñados con más detalle a continuación, una composición de levamisol y una vacuna clostridial es más eficaz a niveles de fosfato de levamisol al 22 %, que es equivalente a levamisol base al 14,9 %. Las composiciones que contienen levamisol dosificadas a estos niveles muestran una marcada mejora en los niveles de anticuerpos contra *clostridium tetani*, *clostridium chauvoei*, *clostridium septicum*, *clostridium perfringens* tipo D y *clostridium novyi* tipo B cuando se compara con el Nilvax™ en ovejas embarazadas 14 días después de la administración. Cuando se clasifica según la eficacia en la promoción de una respuesta de anticuerpos, la composición de fosfato de levamisol al 22 % de la de la presente invención mostró ser globalmente más eficaz que Nilvax™, y más eficaz que una composición que contiene 15 % de fosfato de levamisol.

El uso de fosfato de levamisol al 22 % en la composición, cuando se administra de acuerdo con el régimen de dosificación de la presente invención, da como resultado una administración consistente de levamisol al animal de entre 6,5 - 8,3 mg/kg/en peso sin tener en cuenta el peso del animal. Como entendería una persona experta en la materia, este nivel de administración está cercano al nivel de dosificación preferido de fosfato de levamisol de 7,5 mg/kg/en peso. Se ha demostrado en la técnica anterior que 7,5 mg/kg/en peso es el nivel más eficaz de levamisol para el tratamiento de la helmintiasis en animales. Cuando se compara con los niveles de levamisol administrados utilizando las formulaciones y los regímenes de dosificación conocidos, la novedosa formulación de la actual invención proporciona una composición que no es solo más eficaz para aumentar la respuesta del anticuerpo en animales, sino que es también más eficaz en la administración consistente de una cantidad eficaz de levamisol para el tratamiento de la helmintiasis en animales.

Peso mín. (kg)	Peso máx. (kg)	Dosis Levivax 22 %	Dosis Nilvax™ 10 %	Levamisol administrado mg/kg/en peso Levivax 22 % (14,9 % base)	Levamisol administrado mg/kg/en peso Nilvax™ 10 % (6,8 % base)
20	25	-	3,5	-	11,9 - 9,50
26	35	-	4,0	-	10,4 - 7,7
36	45	2,0	4,0	8,3 - 6,6	7,5 - 6,04
46	55	2,5	4,0	8,1 - 6,8	5,91 - 4,9
56	65	3,0	4,0	8,0 - 6,6	4,8 - 4,1
66	75	3,5	4,5	7,9 - 6,9	4,6 - 4,08
76	85	4,0	4,7 (prom.)	7,8 - 7,0	4,2 - 3,76
86	90+	4,5	5,0	7,8 - 7,45	3,95 - 3,78

En una realización preferida, la vacuna clostridial puede ser una preparación antigénica para una cualquiera o más de las siguientes enfermedades producidas por las bacterias del género Clostridium:

- gangrena gaseosa (*Clostridium perfringens* A),
- disentería del cordero (*Clostridium perfringens* B),
- locura (*Clostridium perfringens* C),
- riñón pulposo (*Clostridium perfringens* D),
- edema maligno (*Clostridium septicum*),
- gangrena enfisematosa (*Clostridium chauvoei*),
- tétanos (*Clostridium tetani*),

- leishmaniosis visceral (*Clostridium novyi* B),
- hemoglobinuria (*Clostridium haemolyticum*),
- infecciones por *C. sordelli* (*Clostridium sordelli*).

5 Como apreciará una persona experta en la técnica, en la presente invención puede utilizarse cualquier vacuna clostridial conocida o aquellas que están todavía en desarrollo individualmente o de manera combinada.

En la forma más preferida, la vacuna de la presente invención incluye preparaciones antigénicas de *Clostridium perfringens* D, *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium tetani* y *Clostridium novyi* B.

La cantidad preferida de la vacuna proporcionada en la presente composición cumple las dosificaciones recomendadas proporcionadas en el Código Veterinario Británico. Por ejemplo;

- 10
- *Antitoxina Alfa de Clostridium Oedematiens* para caballos y ganado 45000 a 75000 y para oveja 9000 a 15000 unidades.
  - *Antitoxina de Clostridium Perfringens de Tipo B* para la prevención de la disentería del cordero, inyección subcutánea en ovejas 1500 unidades y para corderos 6000 unidades.
- 15
- *Antitoxina de Clostridium Perfringens de Tipo D* para el tratamiento de la enfermedad del riñón pulposo mediante inyección subcutánea en ovejas, 1500 unidades y para corderos 600 unidades.
  - La dosis profiláctica de *antitoxina de Clostridium Tetani* mediante inyección subcutánea para caballos y ganado no es menor de 3000 unidades, para ovejas y terneros, no es menor de 500 unidades y para corderos no es menor de 250 unidades.

20 Las dosificaciones recomendadas y los procedimientos preparativos de las diversas vacunas crostridiales en la BP Veterinary se incluyen en el presente documento a modo de referencia

25 Una persona experta en la técnica entenderá que no sería cómodo pesar a cada animal individual antes de la administración y por tanto, el intervalo de peso proporcionado es aproximado. Debe entenderse también que la composición y los regímenes de dosificación de la presente invención no están previstas para animales pequeños, tales como corderos (dado que reciben anticuerpos maternos de la madre y por tanto no requieren vacunación cuando son muy pequeños), sino que se han desarrollado para asegurar que todos los animales adultos reciben una cantidad eficaz de levamisol y vacuna mediante la administración de la novedosa composición en un intervalo de dosis establecido. Las limitaciones impuestas en el régimen de dosificación aseguran que los animales no reciben una cantidad tóxica de levamisol, una cantidad ineficaz, o una cantidad que puede aumentar la probabilidad de desarrollo de resistencia. Los niveles consistentes de levamisol administrados para toda la gama de pesos del animal adulto utilizando el régimen de dosificación de la invención actual han demostrado también ser sorprendentemente eficaces en el aumento de la respuesta de anticuerpos de los animales para una gama de diferentes antígenos clostridiales.

30

35 En una realización preferida adicional de la invención se proporciona una vacuna y una composición de levamisol tal como se ha descrito anteriormente, en la que la composición comprende además al menos una sustancia beneficiosa adicional.

En la presente memoria descriptiva, debe considerarse que el término 'sustancia beneficiosa' significa cualquier sustancia a partir de la cual un animal al cual se administra recibe un efecto beneficioso. La sustancia beneficiosa puede incluir por ejemplo vitaminas, elementos traza, minerales, proteínas o enzimas, por nombrar por ejemplo unos pocos.

40 Más preferentemente, la sustancia beneficiosa se selecciona entre el grupo que incluye vitamina B<sub>12</sub>, cobalaminas, cianocobalaminas y selenio.

45 La vitamina B<sub>12</sub> es una vitamina que contiene cobalto que necesitan las células de todo el cuerpo para la conversión de los nucleótidos de ribosa en nucleótidos de desoxirribosa, una etapa principal en la formación de ácido desoxirribonucleico (ADN). Es, por tanto, un nutriente esencial para la maduración nuclear y la división celular. Los rumiantes adultos no dependen de una fuente alimenticia para obtener la vitamina B<sub>12</sub> debido a que bacterias del rumen sintetizan toda la vitamina B<sub>12</sub> necesaria. Sin embargo, los microorganismos ruminales requieren cobalto para sintetizar esta vitamina.

50 Durante la administración de una vacuna a un animal (que es un estímulo antigénico significativo), la administración adicional de una cantidad de cobalto potenciará la utilización de ácido propiónico (un ácido graso libre volátil) que es una fuente principal de energía. El metabolismo del ácido propiónico está interferido por una deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>, y, por tanto, una ventaja adicional de la presente invención es proporcionar una sustancia beneficiosa adicional que asegurará que la vitamina B<sub>12</sub> se mantenga a un nivel saludable en el animal. Incluso de forma más preferente, la sustancia beneficiosa es la vitamina B<sub>12</sub> preferentemente a una concentración de 0,05 - 0,14 % o 0,5 - 1,4 mg/ml.

La composición se fabrica preferentemente en una dosificación administrable fácilmente para uso subcutáneo o intramuscular. En una realización preferida, la composición puede administrarse mediante inyección.

La composición y el régimen de dosificación de la presente invención tienen numerosas ventajas si se comparan con las composiciones actuales y los regímenes de dosificación conocidos en la materia.

- 5 La composición de la presente invención proporciona un tratamiento mejorado para la helmintiasis en animales y una respuesta aumentada de la vacuna clostridial en ovejas, ovejas preñadas y corderos, cuando se comparan con composiciones conocidas.

10 Específicamente, las composiciones que contienen fosfato de levamisol al 22 % han mostrado aumentar las respuestas promedio de anticuerpos a *C. perfringens* Tipo D, *C. tetani*, *C. chauvoei*, *C. septicum* y *C. novyi* Tipo B en animales, cuando se compara con otras composiciones.

15 La novedosa composición, cuando se administra utilizando el régimen de dosificación de la presente invención, proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de levamisol a animales en una amplia gama de pesos corporales a través de la administración de dosis individuales de una composición menor a las que son actualmente conocidas. Los animales en el intervalo superior de 36 kg - 105 kg reciben una dosificación de levamisol que es eficaz para numerosos parásitos limitantes aumentando al mismo tiempo la eficacia de la vacuna. La dosificación es suficientemente elevada incluso en animales menos pesados, de tal manera que está muy disminuido el riesgo de que se desarrolle resistencia.

20 Otro factor ventajoso es que al administrar la vacuna y la composición de levamisol a dosis más bajas que las anteriormente conocidas, el coste por animal se ve muy reducido. Esto es particularmente significativo cuando se tratan un gran número de animales. El desperdicio es reducido dado que cada animal está recibiendo la mínima cantidad de medicamento necesaria para proporcionar un tratamiento eficaz.

25 El hallazgo de que menores cantidades de dosificación proporcionan una respuesta de anticuerpos significativamente aumentada y por tanto, una probabilidad de prevención de la enfermedad clostridial, junto con una administración más consistente de levamisol para el tratamiento de la helmintiasis es tanto sorprendente como una ventaja considerable para el granjero sobre composiciones conocidas que requieren niveles de dosificación superiores y proporcionan resultados menos satisfactorios.

Se obtienen ventajas adicionales de la inclusión de vitamina B<sub>12</sub> en la composición.

30 La adición de vitamina B<sub>12</sub> a la composición de levamisol para vacuna suministra al menos una disponibilidad temporal de la captación de para el animal. Esto es particularmente deseable si el animal está en el estado comprometido que puede esperarse tras la administración de una vacuna.

La vitamina B<sub>12</sub> ayuda también a la producción de lana. La resistencia de la fibra puede verse afectada negativamente en un animal al que se ha estimulado con una preparación antigénica, y la presencia de vitamina B<sub>12</sub> proporciona efectos positivos sobre el metabolismo del animal.

35 Existe una probabilidad reducida de desarrollo de resistencia de parásitos a levamisol. El solicitante cree que esto se puede deber a un aumento en la actividad del sistema inmune que puede ayudar y limitar el número de parásitos. La mayor eficacia del levamisol en presencia de vitamina B<sub>12</sub> también garantiza que todos los parásitos se destruyen de nuevo, y disminuye la posibilidad de desarrollo de resistencia.

Se proporcionan a continuación ejemplos de la preparación de un medicamento de acuerdo con la presente invención.

#### 40 **Ejemplo de preparación de vacuna**

En general, se pueden preparar vacunas para su uso en la presente invención de acuerdo con los estándares que se muestran en la Farmacopea Británica (Vet).

45 Se hicieron crecer cultivos de vacunas en tanques de fermentación profundos. Cuando se completa la producción de toxoide, el cultivo se formaliza a un pH adecuado y se mantiene la temperatura hasta que el toxoide es estéril y no tóxico.

Se retiraron las células procedentes del toxoide mediante técnicas de centrifugación estéril y se purificó el toxoide físicamente, se concentró y se almacenó en recipientes estériles a 4 °C.

El toxoide a granel concentrado se usó como vacuna para estimular una respuesta inmune contra la toxina.

50 Se añadió el toxoide a granel concentrado al adyuvante de hidróxido de aluminio estéril y se preparó hasta un volumen con solución salina normal estéril. Este se mantuvo en tanques de absorción preesterilizados durante no menos de 24 horas.

A continuación se añadieron conservantes adecuados como será evidente para los expertos en la materia.

### Ejemplo de medicamento combinado

Una composición adecuada de acuerdo con la invención comprenderá una mezcla de vacuna, por ejemplo, toxoides clostridiales fabricados de acuerdo con protocolos de la Farmacopea Británica (Vet), fosfato de levamisol a una concentración de 220 mg/ml, uno o más conservantes, adyuvantes y agua para inyección.

En variaciones de la fórmula preferida, se puede añadir opcionalmente vitamina B<sub>12</sub>, a una concentración de aproximadamente 0,05 - 0,14 mg/ml.

Se ajustó el pH a preferentemente 4-5 y lo más preferente 4,5. Se sabe que la vacunación estimula el sistema inmune para producir anticuerpos 1-2 semanas después de la inyección. En animales tales como ovejas, para proporcionar una cobertura adecuada en animales no vacunados anteriormente, una primera dosis de sensibilización del medicamento se puede reforzar mediante una segunda inyección, por ejemplo, a las 4-6 semanas, y posteriormente mediante refuerzos anuales.

Sin embargo, en todos los casos, la composición de la invención debe administrarse de acuerdo con la buena práctica veterinaria, y en particular, debe administrarse de forma adecuada de acuerdo con el régimen de vacunas concreto determinado por un veterinario u otra persona calificada experta en la materia.

La composición de la presente invención se ensayó en ovejas embarazadas y corderos tras el nacimiento. Los resultados de este estudio se reseñan a continuación.

### Ensayos con animales

Se llevó a cabo un estudio piloto de eficacia en campo, ciego, con grupos paralelos, para evaluar la eficacia de las vacunas clostridiales multivalentes con diferentes niveles de levamisol administrados a ovejas en la última fase del embarazo sobre el título de anticuerpos de ovejas y sus corderos.

Se determinó la capacidad de diversas vacunas de ensayo y de referencia en la composición con levamisol para elevar el nivel de anticuerpos contra antígenos de *clostridium tetani*, *clostridium chauvoei*, *clostridium septicum*, *clostridium perfringens* tipo D y *clostridium novyi* tipo B en ovejas 14 días después del tratamiento y en ovejas y corderos 14 días después de la época de nacimiento de los corderos.

Cincuenta y dos ovejas preñadas de un único feto que habían sido vacunadas previamente antes del embarazo con una vacuna clostridial antes de la época de nacimiento de los corderos en 2007 se distribuyeron en uno de los cuatro grupos de tratamiento utilizando un diseño de bloques aleatorizados con grupos compensados según el peso en vivo de la oveja. Las composiciones de la presente invención se representan por el nombre "Levivax".

En el día 0 del estudio, se recogieron especímenes fecales antes del tratamiento de las ovejas asignadas para recibir tratamientos que contienen levamisol: control negativo (solución salina), Levivax al 15 %, Levivax al 22 %, y Nilvax™ (fosfato de levamisol al 10 %). Se recogieron especímenes fecales de los mismos animales 14 días después del tratamiento.

Tabla 1. Grupos de animales y tratamientos

Grupo	Sustancia de ensayo/control	n
1	Suero salino (control negativo)	13
2	Levivax (Fosfato de levamisol 15 % p/v)	13
3	Levivax (Fosfato de levamisol 22 % p/v)	13
4	Nilvax™™ (Fosfato de levamisol 10 % p/v)	13
Total 52		

Se extrajeron especímenes de sangre de todas las ovejas antes del tratamiento (día 0 del estudio), 14 días después del tratamiento (día 14 del estudio) y 14 a 21 días después de la época de nacimiento de los corderos (días 44-58 del estudio). Se extrajeron especímenes de sangre de los corderos entre 14 y 21 días de edad. Se recogieron especímenes séricos de animales individuales y conjuntos de sueros combinados en el grupo de tratamiento. Los especímenes séricos de animales individuales y combinados se ensayaron para determinar los niveles de anticuerpos.

Se trataron las ovejas en el día 0 del estudio inyectando una única dosis por vía subcutánea en la parte anterior del cuello. La pauta de tratamiento con Levivax al 15 %, Levivax al 22 %, y Nilvax™ fue dependiente del peso de la oveja viva (Tabla 2).

45

Tabla 2. Dependencia de la dosis del peso de la oveja viva

Producto	Intervalo de peso de la oveja (kg)	Dosis (ml)	Producto	Intervalo de peso de la oveja (kg)	Dosis (ml)
Nilvax™™ (10 %)	26-65	4,0	Levivax (22 %)	46-55	2,3
	66-80	4,5		56-65	2,9
	81-90	5,0		66-75	3,5
	91-95	5,5		76-85	4,0
	96-100	6,0		86-95	4,6
Levivax (15 %)	46-55	2,2		96-105	5,2
	56-65	2,8		105+	5,8
	66-75	3,3			
	76-85	3,9			
	86-95	4,4			
	96-105	5,0			
	105+	5,5			

## Resultados

### Clostridium tetani

- 5 Los resultados de los niveles de anticuerpos contra *Clostridium tetani* recogidos en el día 0, 14 y entre el día 44 y 58 del estudio procedentes de ovejas tratadas con los productos del control negativo, Levivax al 15 %, Levivax al 22 % y Nilvax™ se muestran a continuación en la tabla 3.

10 En el día 0 del estudio, los niveles promedio del anticuerpo para el antígeno de *C. tetani* no difieren entre el control negativo y los otros 3 grupos de tratamiento. En el día 14 del estudio, las respuestas del anticuerpo de las ovejas contra el *Cl. tetani* en el tratamiento del control negativo disminuyeron desde los niveles anteriores al tratamiento mientras que el resto de tratamientos dieron como resultado un aumento. Catorce a veintidós días después de la época de nacimiento de los corderos, los días 44-58 del estudio, las respuestas del anticuerpo de las ovejas disminuyeron a niveles menores que los observados en el día 0 para las ovejas en todos los grupos de tratamiento.

15 En el día 14 del estudio, las ovejas tratadas con Levivax al 15 % dieron como resultado un título más bajo que Nilvax™, sin embargo Levivax al 22 % dio un rendimiento mejor que Nilvax™ y Levivax al 15 %.

En los días 44-58 del estudio, basándose en los niveles de anticuerpo contra *Cl. tetani*, Levivax al 15 % y Levivax al 22 % dieron un rendimiento similar a Nilvax™.

20 Tabla 3. Nivel de anticuerpo contra *Clostridium tetani* (promedio ± error estándar del promedio) en suero recogido el día del estudio 0, 14 y entre los días 44 y 58 de ovejas tratadas con los productos control negativo, Levivax al 15 %, Levivax al 22 % y Nilvax™.

Tratamiento	Grupo	Nivel de anticuerpo contra <i>Cl. tetani</i> promedio			Cambio promedio en los anticuerpos comparado con el día 0	
		Día del estudio			Día del estudio	
		0	14	44-58	14 a 0	44-58 a 0
Control negativo	1	38,8±3,6	30,5±4,2	21,7±3,4	-7,0±1,9	-16,0±2,3
Levivax al 15 %	6	33,8±4,4	51,5*±4,5	24,6±3,8	15,7*±4,6	-7,6±1,5
Levivax al 22 %	7	43,1±6,1	75,1*±11,4	29,9±7,1	33,3*±7,2	-12,2±4,0
Nilvax™	8	37,3±3,9	69,7*±4,6	35,2*±3,3	34,5*±4,2	-2,1*±2,9

\* indica niveles de anticuerpo significativamente diferentes del grupo de control negativo (P<0,05)

Clostridium chauvoei

Se recogieron los niveles de anticuerpos contra *Clostridium chauvoei* en el día 0, 14 y entre los días 44 y 58 del estudio a partir de ovejas tratadas con productos del control negativo, Levivax al 15 %, Levivax al 22 % y Nilvax™. Los resultados se muestran en la tabla 4 siguiente.

5 El nivel promedio de anticuerpos contra *Cl. chauvoei* en los especímenes recogidos a partir de ovejas del control negativo en el día 0 fue significativamente mayores que los recogidos de ovejas en los 3 tratamientos restantes. En el día 14 del estudio, los niveles de anticuerpos disminuyeron en el tratamiento del control negativo y aumentaron en los 3 tratamientos restantes. Los especímenes séricos recogidos entre el día 44 y 58 del estudio procedentes de ovejas tratadas con Levivax al 15 % y Levivax al 22 % tuvieron mayores niveles de anticuerpos que en el tratamiento

10 previo (día 0) mientras que en ovejas con tratamiento con Nilvax™ disminuyeron por debajo de estos niveles.

En el día 14 del estudio, el nivel de anticuerpos contra *Cl. chauvoei* de las ovejas tratadas con Levivax al 15 % y Levivax al 22 % dio un rendimiento mejor que Nilvax™, dando Levivax al 22 % un rendimiento particularmente bueno.

15 En los días 44-58 del estudio, basándose en el nivel promedio de anticuerpo contra *Cl. chauvoei*, Levivax al 15 % y Levivax al 22 %, dieron un rendimiento ligeramente mejor que Nilvax™.

Tabla 4. Nivel de anticuerpo contra *Clostridium chauvoei* (promedio ± error estándar del promedio) en suero recogido el día del estudio 0, 14 y entre los días 44 y 58 de ovejas tratadas con los productos control negativo, Levivax al 15 %, Levivax al 22 % y Nilvax™.

Tratamiento	Grupo	Nivel de anticuerpo contra <i>Cl. chauvoei</i> promedio#			Cambio promedio en los anticuerpos comparado con el día 0#	
		Día del estudio			Día del estudio	
		0	14	44-58	14 a 0	44-58 a 0
Control negativo	1	27,0±3,8	20,4±3,4	17,2±3,1	-5,6±1,8	-8,7±1,3
Levivax al 15 %	2	15,6±1,6	32,0±4,4	17,3±1,7	16,6*±4,3	3,0*±1,8
Levivax al 22 %	3	21,2±4,1	53,7*±9,8	23,1±6,7	33,0*±6,5	1,7*±3,0
Nilvax™	4	15,6±2,3	22,3±3,6	12,8±1,9	8,2*±2,4	-2,8±1,1

# Valores p basados en el análisis de los datos transformados con Log<sub>10</sub>  
 \* indica niveles de anticuerpo significativamente diferentes del grupo de control negativo (P<0,05)

20 Clostridium septicum

Se recogieron los niveles de anticuerpos en suero contra *Clostridium septicum* en el día 0, 14 y entre el día 44 y 58 del estudio procedentes de ovejas tratadas con el control negativo, Levivax al 15 %, Levivax al 22 % y Nilvax™. Los resultados se muestran en la tabla 5 siguiente.

25 Los anticuerpos séricos para el antígeno de *Cl. septicum* en el día 0 del estudio fueron superiores en ovejas en el tratamiento del control negativo, pero estas diferencias no fueron significativas. En el día 14 del estudio, los niveles de anticuerpos del suero recogidos a partir de ovejas en los tratamientos con Levivax al 15 %, y Levivax al 22 % fueron mayores que los observados en el tratamiento con el control negativo (P<0,05). Tras la época de nacimiento de los corderos, los niveles de anticuerpos siguieron siendo mayores que los niveles previos al tratamiento para ovejas tratadas con Levivax al 15 % y Levivax al 22 %

30 En el día 14 del estudio, el nivel de anticuerpo contra *Cl. septicum* de las ovejas tratadas con Levivax al 15 % y Levivax al 22 % fue significativamente mayor que las tratadas con Nilvax™ o el control negativo.

En los días 44-58 del estudio, basándose en los niveles promedio de anticuerpos contra *Cl. Septicum*, Levivax al 15 % y Levivax al 22 % tuvieron un rendimiento ligeramente mejor que Nilvax™.

35 Globalmente, Levivax al 15 % y Levivax al 22 % mostraron aumentos significativos en los niveles de anticuerpos contra *Cl. Septicum* entre el día 0 y los días 44-58. Nilvax™ y el control negativo indicaron una disminución en la cantidad promedio de anticuerpo sérico presente entre el día 0 y los días 44-58.

Tabla 5. Nivel de anticuerpo contra *Clostridium septicum* (promedio ± error estándar del promedio) en suero recogido el día del estudio 0, 14 y entre los días 44 y 58 de ovejas tratadas con los productos control negativo, Levivax al 15 %, Levivax al 22 % y Nilvax™.

Tratamiento	Grupo	Nivel de anticuerpo contra <i>Cl. septicum</i> promedio#			Cambio promedio en los anticuerpos comparado con el día 0#	
		Día del estudio			Día del estudio	
		0	14	44-58	14 a 0	44-58 a 0
Control negativo	1	43,6±5,5	36,6±5,0	30,3±4,3	-5,9±4,9	-11,7±3,4
Levivax al 15 %	2	29,7±4,3	62,1*±6,1	33,5±4,8	32,3*±5,1	6,8*±4,2
Levivax al 22 %	3	36,7±6,7	92,0*±10,5	38,8±7,8	55,2*±5,6	4,7*±3,4
Nilvax™	4	32,0±4,5	44,9±4,1	25,7±3,4	16,0*±2,8	-6,3±2,4

# Valores p basados en el análisis de los datos transformados con Log<sub>10</sub>  
 \* indica niveles de anticuerpo significativamente diferentes del grupo de control negativo (P<0,05)

5 Clostridium perfringens tipo D

Se recogieron los niveles de anticuerpos contra *Clostridium perfringens* tipo D en suero en el día 0, 14 y entre los días 44 y 58 del estudio procedentes de ovejas tratadas con el control negativo, Levivax al 15 %, Levivax al 22 % y Nilvax™. Los resultados se muestran en la tabla 6 siguiente.

10 El nivel de anticuerpos dirigidos contra el antígeno de *Cl. perfringens* tipo D en suero recogido en el día 0 no difiere entre las ovejas en los 4 grupos de tratamiento. En el día 14, los niveles de anticuerpos disminuyeron ligeramente en el control negativo y aumentaron significativamente en todos los otros tratamientos. Tras la época de nacimiento de los corderos, el nivel de anticuerpos siguió siendo superior que los niveles previos al tratamiento en los grupos de tratamiento con Levivax al 15 % y Levivax al 22 %.

15 En los días 44-58 del estudio, basándose en los niveles promedio de anticuerpos contra *Cl. perfringens* tipo D, Levivax al 15 % y Levivax al 22 % tuvieron rendimientos similares a Nilvax™.

Tabla 6. Nivel de anticuerpo contra *Clostridium perfringens* tipo D (promedio ± error estándar del promedio) en suero recogido el día del estudio 0, 14 y entre los días 44 y 58 de ovejas tratadas con los productos control negativo, Levivax al 15 %, Levivax al 22 % y Nilvax™.

Tratamiento	Grupo	Nivel de anticuerpo contra <i>Cl. perfringens tipo D</i> promedio			Cambio promedio en los anticuerpos comparado con el día 0	
		Día del estudio			Día del estudio	
		0	14	44-58	14 a 0	44-58 a 0
Control negativo	1	46,8±6,3	40,6±7,5	28,9±6,3	-4,3±3,7	-15,5±3,3
Levivax al 15 %	2	36,4±4,1	76,9*±4,0	44,9*±5,3	39,9*±4,1	10,2*±4,3
Levivax al 22 %	3	40,4±6,4	93,1*±5,7	45,7*±6,0	51,5*±4,6	9,5*±2,4
Nilvax™	4	38,6±4,5	71,8*±4,2	48,2*±3,8	35,5*±3,5	9,6*±3,6

\* indica niveles de anticuerpo significativamente diferentes del grupo de control negativo (P<0,05)

20 Clostridium novyi tipo B

Se recogieron los niveles de anticuerpos contra *Clostridium novyi* tipo B en suero en el día 0, 14 y entre el día 44 y 58 del estudio a partir de ovejas tratadas con el control negativo, Levivax al 15 %, Levivax al 22 % y Nilvax™. Los resultados se muestran en la tabla 7 siguiente.

25 El nivel de anticuerpos contra el antígeno de *Cl. Novyi* tipo B en suero recogido en el día 0 del estudio no difiere entre las ovejas en los 4 tratamientos. En el día 14 del estudio, el nivel de anticuerpos en el suero de las ovejas en el grupo del control negativo disminuyó ligeramente pero aumentó para las ovejas en los tratamientos restantes. Tras la época de nacimiento de los corderos, los niveles de anticuerpos siguieron siendo mayores que los niveles previos al tratamiento para las ovejas que recibieron los tratamientos con Levivax al 15 % y Levivax al 22 %.

En el día 14 del estudio, el nivel de anticuerpos contra *Cl. Novyi* tipo B indicó que Levivax al 15 % tuvo un rendimiento similar a Nilvax™, sin embargo Levivax al 22 % tuvo un rendimiento significativamente mejor, siendo el nivel promedio de anticuerpos aproximadamente 4 veces el de Nilvax™ o Levivax al 15 %.

5 En los días 44-58 del estudio, basándose en los niveles de anticuerpos contra *Cl. Novyi* tipo B, Levivax al 15 % y Levivax al 22 % fueron mayores que Nilvax™.

Tabla 7. Nivel de anticuerpo contra *Clostridium novyi* tipo B (promedio ± error estándar del promedio) en suero recogido el día del estudio 0, 14 y entre los días 44 y 58 de ovejas tratadas con los productos control negativo, Levivax al 15 %, Levivax al 22 % y Nilvax™.

Tratamiento	Grupo	Nivel de anticuerpo contra <i>Cl. novyi</i> tipo B promedio#			Cambio promedio en los anticuerpos comparado con el día 0#	
		Día del estudio			Día del estudio	
		0	14	44-58	14 a 0	44-58 a 0
Control negativo	1	13,0±2,3	9,2±1,9	5,5±1,3	-3,3±1,8	-7,1±1,5
Levivax al 15 %	2	5,9±1,5	12,9±2,9	6,5±1,9	7,8±2,5	2,0*±2,0
Levivax al 22 %	3	13,5±4,1	44,7*±9,8	13,8±6,2	31,8*±6,3	0,8*±3,1
Nilvax™	4	6,4±1,8	10,5±3,5	3,3±0,9	5,3±2,5	-3,1±1,2

# Valores p basados en el análisis de los datos transformados con Log<sub>10</sub>  
 \* indica niveles de anticuerpo significativamente diferentes del grupo de control negativo (P<0,05)

10 **Resultados en suero de cordero**

Se midió el nivel de anticuerpos de los cinco antígenos clostridiales en suero recogido de corderos entre dos y tres semanas de edad. Los niveles de anticuerpos de cada especie se proporcionan en la tabla 8. Los corderos que nacieron de ovejas tratadas con el producto del control negativo tuvieron un nivel más bajo de anticuerpos contra *Cl. tetani*, *Cl. septicum* y *Cl. perfringens* tipo D, sin embargo, los niveles de anticuerpos contra antígenos de *Cl. Chauvoei* y *Cl novyi* tipo B fueron más bajos en corderos nacidos de ovejas tratadas con Nilvax™.

15 En corderos el nivel de *Cl. tetani* mostró que Levivax al 22 % tuvo un rendimiento similar a Nilvax™ y EweGuard (P>0.1).

20 Las concentraciones de anticuerpos contra *Cl. chauvoei*, *Cl. septicum*, *Cl. perfringens* y *C novyi* indicaron que el tratamiento con IR 5 produjo una respuesta similar al tratamiento con Prolavax 5, Multine 5 en 1 y Ultravac 5 en 1 (P>0,1). Además, Levivax al 15 % y Levivax al 22 % tuvieron un rendimiento similar a Nilvax™ y EweGuard.

Tabla 8. Nivel de anticuerpo contra *Cl. tetani*, *Cl. chauvoei*, *Cl. septicum*, *Cl. perfringens* tipo D y *Cl. novyi* tipo B en suero de cordero recogido entre 14 y 21 días de edad de corderos nacidos de ovejas tratadas con productos control negativo, Levivax 15 %, Levivax 22 % y Nilvax™.

Tratamiento	Grupo	Cl, tetani	Cl, chauvoei	Cl, septicum	Cl, Perfringens D	Cl, Novyi B
Control negativo	1	7,3±2,6	7,9±2,6	14,4±4,0	22,1±6,9	5,0±1,7
Levivax al 15 %	2	13,5±3,0	13,7*±2,6	22,9±4,4	48,6*±5,7	6,5±1,6
Levivax al 22 %	3	18,3±6,9	16,8±6,6	28,3*±6,5	44,7*±7,2	17,0±7,6
Nilvax™	4	27,0*±4,2	6,6±1,8	15,4±2,7	44,1*±3,4	4,0±1,6

# Valores p basados en el análisis de los datos transformados con Log<sub>10</sub>  
 \* indica niveles de anticuerpo significativamente diferentes del grupo de control negativo (P<0,05)

25 **Clasificación general**

La clasificación de la respuesta de anticuerpos de la oveja y el cordero al tratamiento indicó que el tratamiento con el control negativo produjo niveles de anticuerpos más bajos en todos los puntos temporales y para todos los tipos de anticuerpos en las ovejas en el día 14 y en los días 44-58 del estudio. Las clasificaciones de los corderos indicaron que Nilvax™ produjo una respuesta más baja a *Cl. Chauvoei* y Levivax al 15 % y al 22 % tuvieron una respuesta

superior a *Cl. Novyi* tipo B que el tratamiento con el control negativo a los 14 a 21 días de edad. Una combinación de las clasificaciones de las respuesta de los anticuerpos de las ovejas a los 5 antígenos clostridiales en el día 14 y el día 44-58 mostró que Levivax al 22 % tuvo la clasificación superior seguido por Levivax al 15 % en tercer lugar. La clasificación de los niveles de anticuerpos v de los corderos muestran que Levivax al 22 % tuvo el mejor rendimiento seguido por Levivax al 15 % y a continuación Nilvax™.

Régimen de dosificación

En una realización preferida de la invención, se proporciona un régimen de dosificación que puede administrar una cantidad de levamisol con un intervalo de dosificación de entre 6,5 - 8,3 mg/kg/peso corporal. Esta cantidad de dosificación es aproximadamente un 30 % menor que los productos conocidos tales como Nilvax™ cuando se administran de acuerdo con el régimen de dosificación preferida siguiente:

Régimen de dosificación del ejemplo 1

*Tasa de dosis de Levivax al 22 % y base conc. de levamisol resultante en mg/kg de peso corporal*

Peso corporal mín, (kg)	Peso corporal máx, (kg)	Dosis (ml)	mg/kg mín, (en peso)	mg/kg máx, (en peso)	Promedio
36	45	2,0	8,3	6,6	7,45
46	55	2,5	8,1	6,8	7,15
56	65	3,0	8,0	6,6	7,15
66	75	3,5	7,9	6,9	7,4
76	85	4,0	7,8	7,0	7,4
85+		0,5 ml/10 kg			

Como entenderá una persona experta en la materia, las dosificaciones individuales administradas a animales pueden variar ligeramente tal como se ha mostrado anteriormente. Para los fines de comercializar dicho producto tal como se describe en el presente documento es más eficaz comercializar un régimen de dosificación en incrementos ajustados de determinados números. Por ejemplo, el ejemplo de dosificación proporcionado en el ejemplo dos es que se usó en los ensayos animales llevados a cabo en respaldo de la invención actual. Sin embargo, el régimen de dosificación reseñada en el ejemplo uno proporciona un sistema de dosificación más transparente para el usuario, administrando además a la vez la cantidad requerida de vacuna y fosfato de levamisol a los animales. De este modo, las pequeñas variaciones en el régimen de dosificación se consideran incluidas en el ámbito de la presente invención.

Se han descrito los aspectos de la presente invención por medio solo de ejemplo y debe apreciarse que se pueden realizar modificaciones y adiciones del anterior sin apartarse del alcance de la misma tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que incluye 10-15 % en p/v de levamisol base y una vacuna clostridial.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el levamisol está presente en la forma de fosfato de levamisol.
- 5 3. La composición de la reivindicación 2, en la que la composición incluye aproximadamente 22 mg/ml de fosfato de levamisol.
4. La composición de la reivindicación 2, en la que la cantidad de fosfato de levamisol en la composición es aproximadamente 22 % en p/v.
- 10 5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la vacuna clostridial es una preparación antigénica para una o más de las enfermedades seleccionadas entre el grupo que incluye gangrena gaseosa (*Clostridium perfringens* tipo A), disentería del cordero (*Clostridium perfringens* tipo B), enterotoxemia bovina (*Clostridium perfringens* tipo C), riñón pulposo (*Clostridium perfringens* tipo D), edema maligno (*Clostridium septicum*), carbón sintomático (*Clostridium chauvoei*), tétanos (*Clostridium tetani*), hepatitis necrosante (*Clostridium novyi* tipo B), hemoglobinuria (*Clostridium haemolyticum*), infecciones por sordelli (*Clostridium sordelli*).
- 15 6. La composición de la reivindicación 5, en la que la vacuna clostridial incluye la vacuna para el *Clostridium perfringens* Tipo D, *Clostridium tetani*, *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum* y *Clostridium novyi* Tipo B.
7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la composición incluye al menos una sustancia beneficiosa seleccionada entre el grupo que incluye vitamina B12, cobalaminas, cianocobalaminas y selenio.
- 20 8. La composición de la reivindicación 7, en la que la sustancia beneficiosa es vitamina B12, a una concentración de 0,5 - 1,4 mg/ml.
9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición es inyectable.