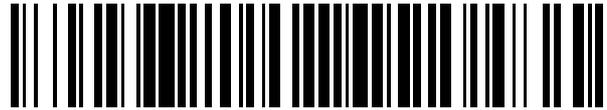


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 480**

51 Int. Cl.:

A61K 39/215 (2006.01)

A61K 31/335 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

A61K 39/15 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2010 E 10764714 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2419131**

54 Título: **Composiciones combinadas de lactona macrocíclica, vacunas y procedimientos para su producción**

30 Prioridad:

14.04.2009 NZ 57620109

20.04.2009 NZ 57639109

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

24.09.2015

73 Titular/es:

MERIAL LTD. (100.0%)

3239 Satellite Blvd.

Duluth, GA 30096-4640, US

72 Inventor/es:

HOLMES, ROBERT WILLIAM LACHLAN y

RAZZAK, MAJID HAMEED ABDUL

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 546 480 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 combinadas de lactona macrocíclica, vacunas y procedimientos para su producción.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a mejoras en el campo de los remedios veterinarios y, más particularmente, a mejoras en relación con las formulaciones de vacunas combinadas que proporcionan protección contra parásitos, así como los virus y/o bacterias que son los factores causantes de la diarrea neonatal de los terneros.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El parto exitoso de la vaca y su transición a la lactancia son dos claves fundamentales para la productividad ganadera. Para que el granjero logre su objetivo de productividad existen dos desafíos críticos de enfermedades que deben ser superados:

15

Parasitismo en la vaca - La demanda de energía del ternero no nacido puede colocar la vaca preñada bajo gran estrés. Como resultado, la condición corporal sufre y el sistema inmunitario se vuelve menos eficaz a la hora de repeler una infección. Uno de los principales tipos de infección es el parasitismo. Por lo general, el ganado adulto tiene un alto grado de inmunidad a la infección del parásito, pero este no es el caso durante el período del parto.

20

Para ayudar a la vaca a superar cualquier carga parasitaria adquirida, los granjeros pueden tratar a las vacas durante el embarazo con antihelmínticos. Estos productos son fármacos diseñados para matar las poblaciones de gusanos residentes, y en algunos casos, evitan la infección adicional durante un período de tiempo. Históricamente se han utilizado fármacos, tales como levamisol, oxfendazol, fenbendazol, albendazol, abamectina e ivermectina. Estos se administran en forma oral, inyectable o tópica. Sin embargo, tienen la desventaja de que existe el riesgo de que estén presentes residuos de estos fármacos antihelmínticos en la leche de la vaca después de haberse producido el parto y haya comenzado la lactancia. En algunos países, dichos antihelmínticos no se pueden utilizar para tratar animales cuya leche se va a utilizar para el consumo humano, mientras que en otros países, el período de tratamiento antes de que comience el período de lactancia debe superar los 60 días.

25

Diarrea neonatal en el ternero - La causa más frecuente de morbilidad en el ternero en el período neonatal es la diarrea. La causa principal de esta diarrea es la presencia de bacterias y virus causantes de la diarrea neonatal, incluyendo *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Rotavirus* y *Coronavirus*; a menudo en combinación y/o con otras bacterias, virus y parásitos intestinales.

30

Virus - La infección por *rotavirus* es la causa viral más común de diarrea en terneros. Los *rotavirus* de los grupos A y B están involucrados, pero el grupo A es más prevalente y clínicamente importante y contiene varios serotipos de diferente virulencia. Los rotavirus se replican en enterocitos productores de enzimas y absorbentes maduros en las vellosidades del intestino delgado, lo que lleva a la ruptura y desprendimiento de los enterocitos con liberación del virus para infectar las células adyacentes. Los rotavirus no infectan las células inmaduras de las criptas. Con cepas virulentas de rotavirus, la pérdida de enterocitos supera la capacidad de las criptas intestinales para reemplazarlos; por lo tanto, se reduce la altura de las vellosidades, con la consiguiente disminución de la superficie de absorción intestinal y la actividad de enzimas digestivas intestinales. Los coronavirus también se asocian habitualmente con la diarrea en terneros. Se replica en el epitelio del tracto respiratorio superior y en los enterocitos del intestino, donde produce lesiones similares a los rotavirus, pero también infecta las células epiteliales del intestino grueso para producir atrofia de las crestas del colon.

35

Bacterias - La infección por *E. coli* es la causa bacteriana más importante de la diarrea en los terneros; al menos 2 tipos distintos de enfermedades diarreicas son producidas por diferentes cepas de este microorganismo. Un tipo se asocia con *E. coli* enterotoxigénica, que tiene 2 factores de virulencia asociados con la producción de la diarrea. Los antígenos fimbriales permiten a las bacterias unirse y colonizar las vellosidades del intestino delgado. Las cepas presentes en los terneros poseen más habitualmente los antígenos fimbriales K99 (F5) o F41, o ambos. Estos antígenos son el foco de la protección inmunológica. La *E. coli* enterotoxigénica también expresa una enterotoxina termoestable no antigénica (Sta) que influye en la secreción de iones y fluidos intestinales para producir una diarrea secretora no inflamatoria. La diarrea en terneros y corderos también se ha asociado con *E. coli* enteropatógena que se adhiere al intestino para producir una lesión de fijación y borramiento, con la disolución del borde en cepillo y pérdida de la estructura microvellosidades en el sitio de unión, una disminución de la actividad de la enzima, y los cambios en el transporte de iones en el intestino. Estos enteropatógenos también se denominan "*E. coli* de fijación y borramiento". Algunos producen verotoxina, que puede estar asociada con una diarrea hemorrágica más grave. La infección más frecuente es en el ciego y el colon, pero el intestino delgado distal también puede verse afectado. El daño en las infecciones graves puede provocar edema y erosiones de la mucosa y la ulceración, dando lugar a una hemorragia en el lumen intestinal.

40

45

50

55

60

[0003] *Clostridium perfringens* tipos A, B, C, y E producen una variedad de toxinas necrotizantes que causan una enteritis hemorrágica rápidamente mortal en terneros. La enfermedad en terneros es rara y generalmente esporádica.

65

[0004] En la actualidad, el tratamiento con antihelmínticos de vacas preñadas se consigue con una formulación antihelmíntica dedicada (oral, tópica y/o inyectable). Estas formulaciones actualmente no contienen ninguna forma de tratamiento con vacunas capaz de proteger al ternero recién nacido. Sin embargo, una serie de vacunas sólo

para diarrea neonatal se comercializan actualmente para su uso en el ganado. Estas vacunas se clasifican generalmente como inactivadas, en referencia al hecho de que la vacuna contiene virus o componentes bacterianos muertos. Habitualmente estas vacunas contendrán cepas inactivadas que proporcionan protección de un número de elementos causantes de la diarrea neonatal (rotavirus, coronavirus, *E. coli*, enfermedades clostridiales). Las vacas son tratadas con la vacuna habitualmente mediante inyección intramuscular profunda con una dosis de entre 2 y 5 ml. Este tratamiento como refuerzo anual poco antes del parto proporciona un fuerte aumento de los anticuerpos en el calostro disponible para el ternero inmediatamente después del parto. Los terneros alimentados con calostro de vacas vacunadas durante las primeras dos a cuatro semanas de vida han demostrado tener:

- incidencia reducida de diarreas causadas por rotavirus y coronavirus
- diseminación reducida de virus reducida debido a la infección por rotavirus o coronavirus
- gravedad reducida de la diarrea causada por *E. coli*.

Las vacunas para diarrea neonatal habituales de este tipo disponibles en los Estados Unidos incluyen:

GUARDIAN® (Schering-Plough). Se trata de una vacuna multicomponente que incluye antígeno K99 de *Escherichia coli*, dos coronavirus inactivados, dos tipos G de rotavirus inactivados, y toxoide bacteriano de *Clostridium perfringens* Tipos C y D. GUARDIAN se recomienda para su uso en el ganado preñado como ayuda en la prevención de la diarrea neonatal de ternero causada por *E. coli* enterotoxigénica pilus tipo K99, rotavirus de serotipo G6 de grupo A bovino, enterotoxemia causada por *C. perfringens* tipos C y D, y como ayuda en el control de la diarrea neonatal de ternero causada por coronavirus bovinos .

SCOURBOS 9 (Novartis). Otra vacuna multicomponente que incluye cuatro cepas diferentes de *E. coli*, tres rotavirus inactivados (serotipos G10, G6 y G8), Coronavirus inactivado y toxoide bacteriano de *Clostridium perfringens* tipo C.

SCOURGUARD (Pfizer). Una combinación de rotavirus bovinos inactivados (serotipos G10, G6), coronavirus inactivado, y toxoide bacteriano de *E. coli* K99.

[0005] Para las tres vacunas, se administra una dosis de 2 ml a través de inyección intramuscular profunda. No se aplica ningún período de retención de la leche a ninguno de los tratamientos. Los programas de tratamiento se basan en un programa de tratamiento de dos dosis en el primer año de uso, y a continuación, una única dosis de refuerzo anual administrada cada año antes del parto. El tiempo recomendado en el que se deben administrar los tratamientos (en semanas previas al parto) se resume en la Tabla 1.

Tabla 1.

	Primer año de tratamiento (tiempo de tratamiento en semanas previas al parto)		Refuerzo anual (tiempo de tratamiento en semanas previas al parto)
	Dosis inicial	Dosis de refuerzo	
GUARDIAN	12 semanas	9-6 semanas	7-5 semanas
SCOURBOS	16-8 semanas	4 semanas	10-8 semanas
SCOURGUARD	9-6 semanas	6-3 semanas	6-3 semanas

[0006] La diferencia en los tiempos de tratamiento se explica por la eficacia relativa reivindicada de los antígenos de vacuna utilizados con cada vacuna. Sin embargo, hay que señalar que el número más cercano de semanas para el parto en las que se recomiendan administrar los tres tratamientos es de 5 semanas (refuerzo anual GUARDIAN), 4 semanas (dosis de refuerzo SCOURBOS) y 3 semanas (dosis de refuerzo y esfuerzo anual SCOURGUARD). En el mejor de los casos sólo son 35 días desde el parto, mientras que en el peor de los casos es de 21 días desde el parto.

[0007] La consecución de altos niveles de anticuerpos en el calostro a través de la utilización de vacunas potentes ha demostrado ser extremadamente eficaz en la prevención de la diarrea neonatal en terneros. El programa de vacunación más eficaz es aquel en el que el nivel de anticuerpos en el sistema de vacas es máximo en o justo antes del parto, proporcionando la máxima protección al ternero a través del calostro. Para este objetivo existe el requisito de que se administre la vacuna anual de refuerzo razonablemente cerca del parto.

[0008] Existe otra razón por la que los fabricantes de vacunas necesitan diseñar sus productos con la posibilidad de que la vacunación se producirá cerca de parto. Esta razón es que normalmente la vacunación tendrá lugar con la manada completa. Las vacas dentro de una manada deberán parir en fechas diferentes en un período de varias semanas o meses. La amplitud del periodo de tiempo para el parto y la imprevisibilidad de la fecha real del parto puede hacer que sea muy difícil para seleccionar el momento ideal para el tratamiento. Para un mejor efecto, las vacunas podrían administrarse 21-35 días (según la vacuna) antes de la fecha de parto esperada más temprana dentro de la manada o 21-35 días antes de fecha de parto promedio esperada dentro de la manada. Algunas vacas pueden parir poco después de la vacunación, mientras que otras pueden parir muchas semanas después. Por otra parte, la imprevisibilidad de la fecha real del parto en comparación con fecha de parto esperada puede significar que algunas vacas parirán mucho antes de 21-35 días después del tratamiento y potencialmente tan pronto como el día del tratamiento. Este breve tratamiento de para los intervalos de los partos elimina la posibilidad de utilizar muchos compuestos activos antihelmínticos diseñados para tratar las vacas preñadas de cualquier potencial combinación de vacunas para diarrea neonatal.

[0009] Las vacunas que contienen lactonas macrocíclicas y antígenos, incluyendo, por ejemplo, péptidos, fracciones de membrana, patógenos inactivados, y similares, son difíciles de formular debido a incompatibilidades

disolvente/dispersante. Existen informes anteriores de la combinación de principios activos más vacunas, pero muy pocos de ellos describen la combinación de lactonas macrocíclicas más una vacuna. Una posible razón para esto es que es bien conocido en la técnica que las lactonas macrocíclicas son susceptibles a la degradación en presencia de otras sustancias activas o en ciertos sistemas de disolventes, en particular los sistemas de disolventes acuosos. Por ejemplo, GB-A-2030043 describe combinaciones inyectables de una lactona no macrocíclica activa (tetramisol) más una vacuna. Es importante destacar que la solicitud no da a conocer composiciones que comprenden agentes de dispersión, que es un componente importante en las composiciones de lactonas macrocíclicas acuosas inyectables. Umehara et al describen que combinando una lactona macrocíclica, doramectina, con una vacuna contra la fiebre aftosa puede causar interferencia (Rev. Brasil Parasitol Vet 1993, 2 (2): 141-144). Otros ejemplos incluyen el documento JP-A-62294623, que describe composiciones orales que comprenden antibióticos y Salmonella desactivada, y el documento GB-A-2267707, que describe lactonas macrocíclicas en combinación opcional con la vacunación. El documento US6746677B2 de Cobb (Wyeth, Fort-Dodge Animal Health) generalmente describe composiciones que comprenden compuestos macrólidos o mezclas de los mismos, un disolvente orgánico soluble en agua, un agente dispersante, un adyuvante, al menos un antígeno, y solución salina o agua o una mezcla de los mismos. Además, la solicitud de patente US 2005/0118222 de Wolff describe incluir simultáneamente, por medio de una inyección, lactona macrocíclica y un antígeno contra las garrapatas. En otro ejemplo, los documentos US 6.663.879 y US6.214.367 de Harvey describen composiciones inyectables estables que incluyen un agente parasitario no acuoso en una cantidad terapéuticamente eficaz, seleccionado del grupo de avermectina, ivermectina, doramectina, abamectina, milbemicina y moxidectina, y un antígeno en combinación con un vehículo líquido que también actúa como adyuvante.

[0010] La presente invención resuelve el problema de combinar lactonas macrocíclicas con vacunas mediante el uso de un sistema de disolventes novedoso y no obvio. A diferencia de los disolventes de alcohol dados a conocer por Cobb, los solicitantes han encontrado que la dimetilacetamida (DMA) en combinación con tensioactivos específicos proporciona formulaciones de lactona macrocíclica/vacuna combinadas excepcionalmente estables y de alta concentración. El volumen de la dosis eficaz resultante es deseablemente menor que las composiciones anteriores.

[0011] Por consiguiente, existe una necesidad real y no satisfecha en la técnica para un medio conveniente para el tratamiento de vacas preñadas que: proteja la vaca de los efectos del parasitismo evitando al mismo tiempo los residuos de antihelmínticos en la leche; reduzca el riesgo de diarrea neonata en el ternero recién nacido debido a enfermedades virales y bacterianas; y proporcione a los granjeros la posibilidad de tratar a las vacas razonablemente cerca de parto.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0012] Por tanto, el problema tratado por la presente invención es la necesidad de proporcionar un tratamiento conveniente de antihelmíntico/vacuna para los granjeros que mantiene la salud de las combinaciones de vaca/ternero garantizando al mismo tiempo que no hay contaminación de la leche con residuos de fármacos, o que, al menos, proporcionará a los granjeros una opción útil. En un aspecto, la presente invención describe un procedimiento para prevenir o controlar enfermedades parasitarias en vacas preñadas y enfermedades virales en terneros recién nacidos mediante la administración parenteral a la vaca preñada de una cantidad eficaz de una composición combinada que contiene al menos un componente viral, tal como rotavirus inactivados o coronavirus inactivados, junto con uno o más compuestos activos de lactona macrocíclica, por ejemplo, eprinomectina, y un portador parenteral adecuado y conservante. El compuesto activo o activos de lactona macrocíclica son abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina o moxidectina. Otro aspecto de la presente invención proporciona composiciones combinadas utilizadas en dichos procedimientos.

[0013] En otro aspecto, el procedimiento también puede controlar la infección por bacterias que causan enfermedades, tales como *E. coli*, mediante la inclusión con el componente viral inactivado un toxoide bacteriano de *E. coli* y/o un toxoide bacteriano producido por otras bacterias causantes de enfermedades. El mismo volumen de dosis se puede administrar al ganado que pesa de 400 kg a 800 kg. Esto tiene la ventaja de que una manada de vacas preñadas puede tratarse rápidamente aplicando el mismo volumen de dosis independientemente del peso de cada vaca, ya que una manada típica consiste en vacas dentro de ese intervalo de peso. Alternativamente, los rangos de peso para cada dosis pueden limitarse de modo que la invención puede proporcionar una dosis de compuesto activo de lactona macrocíclica de 200 µg/kg a 400 µg/kg.

[0014] En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición inyectable para prevenir o controlar enfermedades parasitarias y enfermedades virales en el ganado, conteniendo la composición (a) una cantidad eficaz de al menos un componente viral seleccionado del grupo que consiste en rotavirus inactivados, y coronavirus inactivados, (b) un compuesto activo antihelmíntico de lactona macrocíclica, tal como abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina, moxidectina (c) un portador adecuado, y (d) un conservante. La composición inyectable puede incluir un toxoide bacteriano de *E. coli*.

[0015] En otro aspecto, la presente invención describe un procedimiento para prevenir o controlar enfermedades parasitarias en vacas preñadas y diarrea neonatal en terneros recién nacidos mediante la administración parenteral a la vaca preñada de una cantidad eficaz de una composición combinada que contiene un compuesto activo de

lactona macrocíclica y un componente viral seleccionado del grupo que comprende rotavirus inactivados, coronavirus inactivados y toxoide bacteriano de *E. coli*. En algunos aspectos, la lactona macrocíclica es eprinomectina.

5 **[0016]** A menos que se defina lo contrario en los ejemplos específicos, el término "cantidad eficaz", tal como se usa en el presente documento, significa generalmente una cantidad de componente activo o de vacuna que es suficiente para provocar un "efecto biológicamente útil" en un animal. El "efecto biológicamente útil" puede incluir, por ejemplo: la prevención o el control de parásitos en o sobre animales, la estimulación de una respuesta inmune que protege a dichos animales de la exposición posterior a agentes o patógenos que causan una enfermedad o trastorno, o cualquier otro efecto que un experto entenderá fácilmente como beneficioso, protector y/o propicio para el mantenimiento o la mejora de la salud, el bienestar, la productividad, la longevidad, la resistencia a las enfermedades, y similares, del animal.

15 **[0017]** Estas y otras realizaciones se describen en, o son evidentes a partir de y abarcadas por, la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 **[0018]** La siguiente descripción detallada, proporcionada a modo de ejemplos, pero sin pretender limitar la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse mejor en conjunción con los dibujos adjuntos, en los cuales:

La figura 1 es un gráfico de residuos de eprinomectina en leche

La figura 2 es un gráfico de residuos de ivermectina en leche

La figura 3 es un gráfico de residuos de moxidectina en grasa de la leche

25 **La figura 4** es un gráfico de residuos de moxidectina en leche entera

La figura 5 es un gráfico de residuos de doramectina en leche

La figura 6 es un gráfico de residuos promedio en grupo en leche (eprinomectina, ivermectina, doramectina)

La figura 7 es un gráfico de residuos de moxidectina promedio en grupo en leche entera

DESCRIPCIÓN DETALLADA

30 **[0019]** Cabe señalar que en esta descripción y en particular en las reivindicaciones y/o párrafos, términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se le atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y que términos, tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en", tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos no citados explícitamente, pero excluyen los elementos que se encuentran en la técnica anterior, o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención. Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son a modo de ejemplo y explicativo y no son restrictivas de la invención según se reivindica.

35 **[0020]** La presente invención describe composiciones combinadas que son eficaces para prevenir o controlar infecciones parasitarias, bacterianas o virales en el ganado, que comprenden (a) una cantidad eficaz de un componente viral, que comprende al menos un rotavirus o coronavirus inactivado, y (b) al menos un agente activo de lactona macrocíclica en un portador farmacéuticamente aceptable.

40 **[0021]** El componente viral puede ser una vacuna disponible comercialmente, por ejemplo, las vacunas bovinas RESPISHIELD™ o RELIANT® de Merial. Las vacunas RELIANT® 4, por ejemplo, incluyen ocho combinaciones de antígeno, lo que permite una flexibilidad significativa a composiciones combinadas de la presente invención. El componente viral puede comprender cualquier número de adyuvantes bien conocidos, por ejemplo, adyuvante TS6 de Merial descrito por ejemplo en US 7,371,395 de Parisot et al. El adyuvante TS6 se utiliza actualmente con éxito, por ejemplo, en la vacuna para cerdos SWIVAX™-MH Needle-Free *M. hyopneumoniae* de Merial. El adyuvante también puede ser adyuvante LR4 de Merial, que se describe por ejemplo en US 7.691.368 también de Parisot et al. Por tanto, la presente invención pretende abarcar composiciones combinadas que se pueden aplicar útilmente a al menos animales bovinos y porcinos.

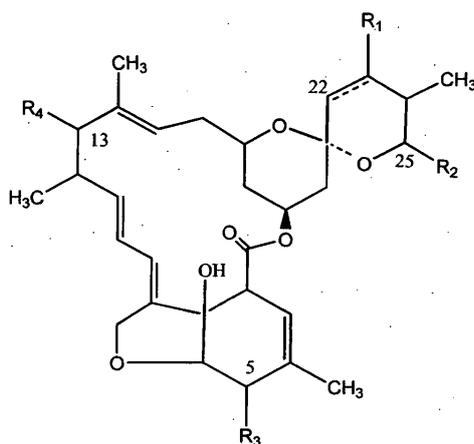
45 **[0022]** También se proporcionan procedimientos para la prevención o control de infecciones parasitarias, bacterianas o virales, que comprenden administrar una cantidad eficaz de las composiciones de la invención al animal con necesidad de las mismas.

60 **[0023]** Los compuestos antihelmínticos de lactona macrocíclica son bien conocidos para un técnico en la materia. Estos compuestos incluyen las avermectinas y milbemicinas, conocidas colectivamente como la clase de lactona macrocíclica de compuestos activos antihelmínticos. Para las avermectinas, ivermectina y abamectina, se puede hacer referencia, por ejemplo, a la publicación "Ivermectin and Abamectin", 1.989, por M.H. Fischer y H. Mrozik, William C. Campbell, publicado por Springer Verlag., "Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy", 2002, por J Vercruysse y RS Rew publicada por CABI Publishing o Albers-Schönberg et al. (1981), "Avermectins Structure Determination", J. Am. Chem. Soc, 103, 4.216-4.221. Para doramectina, puede consultarse "Veterinary

Parasitology", vol. 49, No. 1, julio de 1993, 5-15. Para milbemicinas, se puede hacer referencia, entre otros, a Davies H.G. et al., 1986, "Avermectins and milbemicins", Nat. Prod. Rep., 3, 87-121, Mrozik H. et al., 1983, Synthesis of Milbemicins from Avermectins, Tetrahedron Lett., 24, 5333-5336, patente de Estados Unidos N° 4.134.973 y EP 0 677054.

5
 [0024] Las lactonas macrocíclicas son productos naturales o son derivados semisintéticos de los mismos. Las estructuras de las avermectinas y milbemicinas están estrechamente relacionados, por ejemplo, al compartir un anillo de lactona macrocíclica compleja de 16 miembros; las milbemicinas carecen de la fracción glicosídica de las avermectinas. Los productos naturales avermectinas se describen en la patente de Estados Unidos N° 4.310.519 de Albers-Schönberg et al., y los compuestos de 22,23-dihidro avermectina se describen en Chabala et al., patente de Estados Unidos No. 4.199.569. También se hace mención de Kitano, patente de Estados Unidos No. 4.468.390, Beuvry et al., patente de Estados Unidos n° 5.824.653, EP 0007812 A1, memoria de patente del Reino Unido 139336, EP 0002916, y patente de Nueva Zelanda No. 237 086, entre otras. Las milbemicinas presentes en la naturaleza se describen en Aoki et al., patente de Estados Unidos No. 3.950.360, así como en las diversas referencias citadas en "The Merck Index" 12ª ed., S. Budavari, Ed., Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, Nueva Jersey (1996). La latidectina se describe en las "International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN)", Información de Medicamentos de la OMS, vol. 17, no. 4, pág. 263-286, (2003). Los derivados semisintéticos de estas clases de compuestos son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 5.077.308, patente de Estados Unidos n° 4.859.657, patente de Estados Unidos n° 4.963.582, patente de Estados Unidos n° 4.855.317, patente US n° 4.871.719, Patente US No. 4.874.749, la Patente de Estados Unidos N° 4.427.663, patente de Estados Unidos n° 4.310.519, patente de Estados Unidos n° 4.199.569, patente de Estados Unidos n° 5.055.596, patente de Estados Unidos n° 4.973.711, patente de Estados Unidos n° 4.978.677, patente de Estados Unidos n° 4.920.148 y EP 0 667 054.

25 [0025] Los ejemplos no limitativos de compuestos que pertenecen a esta clase están representados por la Fórmula (I):



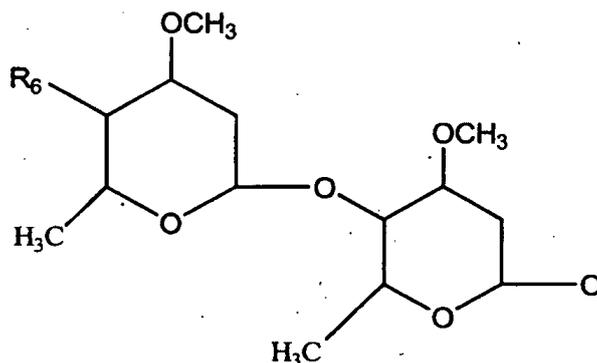
Formula (I)

en la que la línea discontinua indica un enlace simple o un doble enlace en las posiciones 22,23;

R₁ es hidrógeno o hidroxilo, siempre que R₁ esté presente sólo cuando la línea discontinua indica un enlace simple;

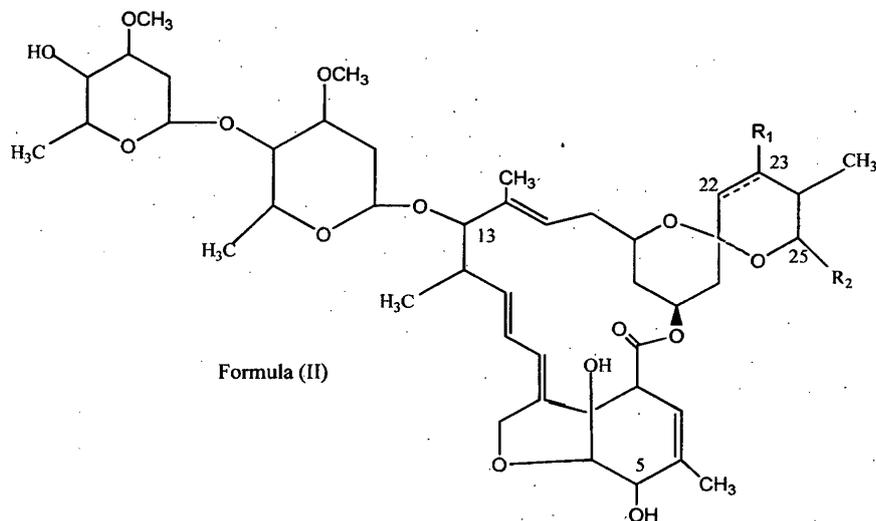
R₂ es alquilo de 1 a 6 átomos de carbono o alqueno de 3 a 6 átomos de carbono o cicloalquilo de 3 a 8 átomos de carbono;

R₃ es hidroxilo, metoxi o = NOR₅, en el que R₅ es hidrógeno o alquilo inferior; y R₄ es hidrógeno, hidroxilo o



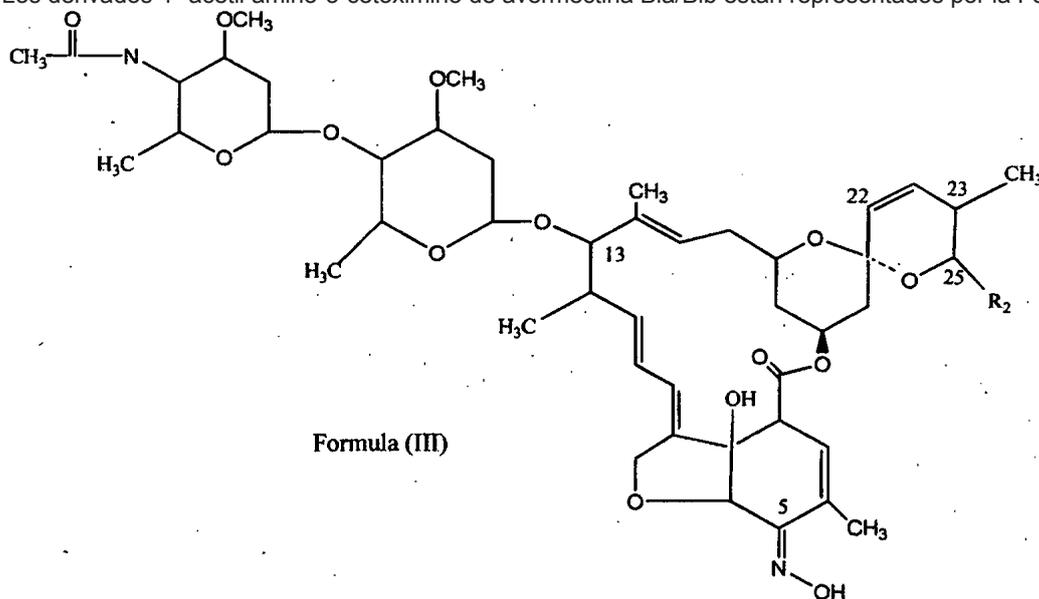
en la que R₆ es hidroxilo, amino, mono- o di-alquilamino inferior o alcanoilamino inferior.

[0026] En algunas realizaciones, los compuestos son avermectina Bla/Blb (abamectina), 22,23-dihidro avermectina Bla/Blb (ivermectina) y el derivado 4"-acetilamino-5-cetoximino de avermectina Bla/Blb. Tanto la abamectina como la ivermectina están aprobados como agentes antiparasitarios de amplio espectro. Las estructuras de abamectina e ivermectina están representados por la Fórmula (II):



30 en la que R₁ y R₂ son como se definen anteriormente para la fórmula (I). Para abamectina la línea discontinua representa un doble enlace y R₁ no está presente y para la ivermectina el doble enlace representa un enlace simple y R₁ es hidrógeno; y R₂ es isopropilo o sec-butilo.

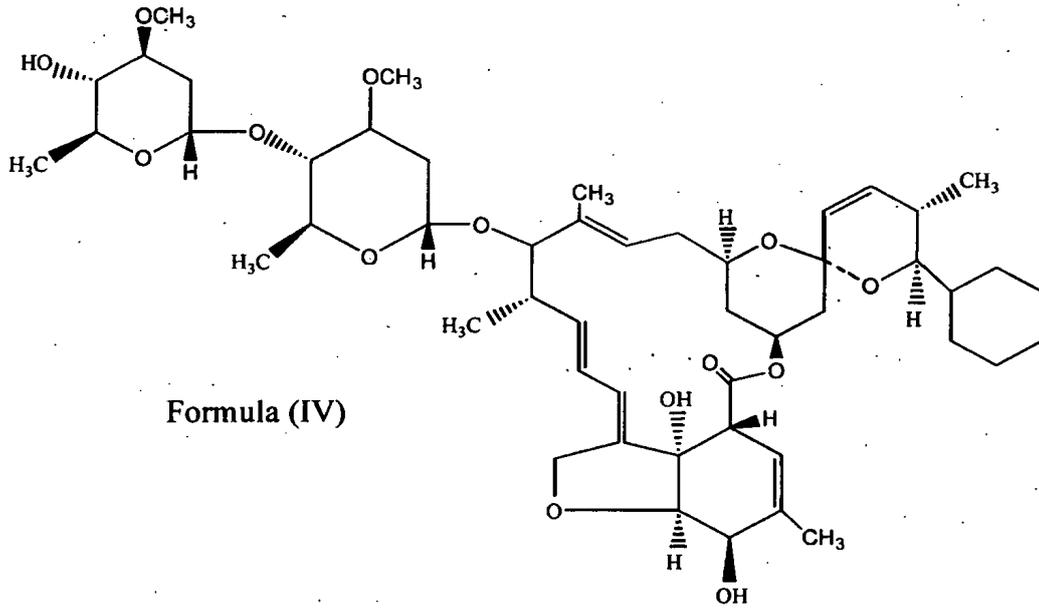
35 [0027] Los derivados 4"-acetil amino-5-cetoximino de avermectina Bla/Blb están representados por la Fórmula (III):



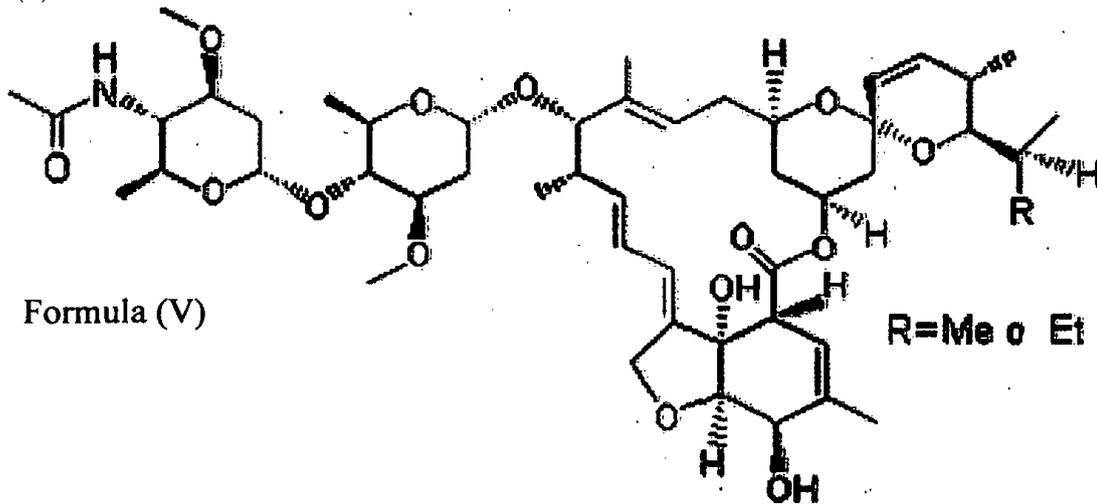
en la que R₂ es isopropilo o sec-butilo.

60 [0028] En algunos aspectos, los productos de avermectina se pueden preparar como una mezcla que comprende al menos el 80% de un compuesto según la Fórmula (II o III) en la que R₂ es sec-butilo y no más del 20% de un compuesto según la fórmula (II o III) en la que R₂ es isopropilo.

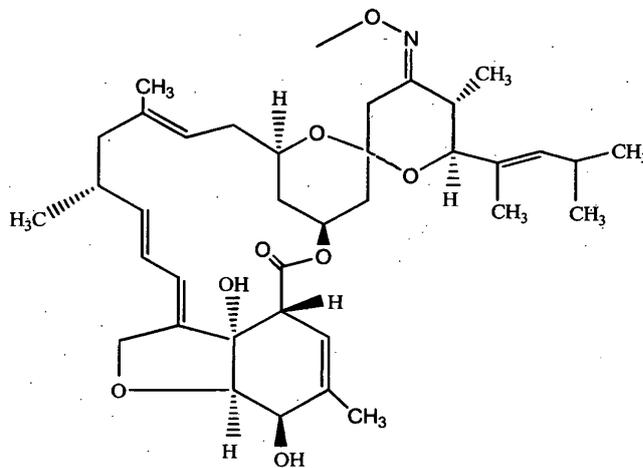
65 [0029] En otros aspectos, las avermectinas pueden incluir emamectina, eprinomectina y doramectina. La doramectina tiene una estructura según la fórmula (V):



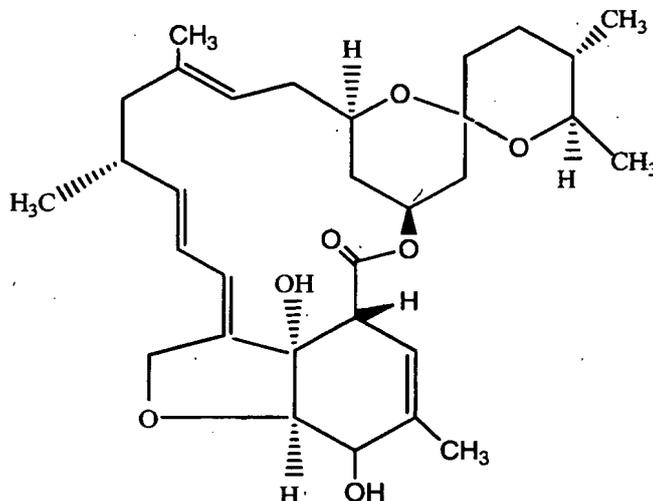
25 **[0030]** La eprinomectina se describe en la patente de Estados Unidos 4.427.663 y tiene una estructura según la Fórmula (V):



45 **[0031]** En algunas realizaciones de la presente invención, la milbemicina es moxidectina, representada por la Fórmula (VI):



[0032] Algunos aspectos pueden incluir los derivados de monosacárido avermectina que tienen una sustitución de oxima en la posición 5 del anillo de lactona. Otros aspectos incluyen milbemicinas, tales como milbemicina α_1 , que está representada por la fórmula (VII).



[0033] También se describen sales de ácido o base de los compuestos en las composiciones de la invención, cuando sea aplicable.

[0034] El término "ácido" contempla todos los ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ácidos inorgánicos incluyen ácidos minerales, tales como hidrácidos halogenados, tales como ácido bromhídrico y ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácidos fosfóricos y ácido nítrico. Los ácidos orgánicos incluyen ácidos carboxílicos, ácidos dicarboxílicos, ácidos tricarboxílicos y ácidos grasos alifáticos, alicíclicos y aromáticos farmacéuticamente aceptables. En un aspecto de los ácidos, los ácidos son ácidos carboxílicos alifáticos C₁-C₂₀ de cadena lineal o ramificada, saturados o insaturados, que están opcionalmente sustituidos por halógeno o por grupos hidroxilo, o ácidos carboxílicos aromáticos C₆-C₁₂. Los ejemplos de dichos ácidos son ácido carbónico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido isopropiónico, ácido valérico, α -hidroxiácidos, tales como ácido glicólico y ácido láctico, ácido cloroacético, ácido benzoico, ácido metanosulfónico, y ácido salicílico. Los ejemplos de ácidos dicarboxílicos incluyen ácido oxálico, ácido málico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido fumárico, y ácido maleico. Un ejemplo de un ácido tricarboxílico es el ácido cítrico. Los ácidos grasos incluyen todos los ácidos carboxílicos alifáticos o aromáticos saturados o insaturados farmacéuticamente aceptables que tienen de 4 a 24 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen ácido butírico, ácido isobutírico, ácido sec-butírico, ácido láurico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linoléico, y ácido fenilestérico. Otros ácidos incluyen ácido glucónico, ácido glicoheptónico, y ácido lactobiónico.

[0035] El término "base" contempla todas las bases inorgánicas u orgánicas farmacéuticamente aceptables, incluyendo hidróxidos, carbonatos o bicarbonatos de metales alcalinos o metales alcalinotérreos. Las sales formadas con dichas bases incluyen, por ejemplo, las sales de metales alcalinos y de metales alcalinotérreos, incluyendo, pero sin limitación, sales de litio, sodio, potasio, magnesio o calcio. Las sales formadas con bases orgánicas incluyen sales de aminas de hidrocarburos y heterocíclicas que incluyen, por ejemplo, sales de amonio (NH₄⁺), sales de alquilamonio y dialquilamino, y sales de aminas cíclicas, tales como las sales de morfolina y piperidina.

[0036] Además, los compuestos pueden existir dentro de las composiciones como hidratos o solvatos, en la que una cierta cantidad estequiométrica de agua o un disolvente está asociada con la molécula en forma cristalina. Las composiciones pueden incluir hidratos y solvatos de los agentes activos.

[0037] Los términos utilizados en el presente documento tendrán su significado habitual en la técnica a menos que se especifique lo contrario. El término "alquilo" se refiere a hidrocarburos saturados lineales, ramificados, cíclicos, primario, secundarios o terciarios, incluyendo los que tienen de 1 a 12 átomos. En algunas realizaciones, los grupos alquilo incluirán grupos alquilo C₁-C₁₀, C₁-C₈, C₁-C₆ o C₁-C₄. Los ejemplos de alquilo C₁-C₁₀ incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo, butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo, pentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1-etil-1-metilpropilo, 1-etil-2-metilpropilo, heptilo, octilo, 2-etilhexilo, nonilo y decilo y sus isómeros. Alquilo C₁-C₄ significa, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo, butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo o 1,1-dimetiletilo.

[0038] El término "alquilo inferior" se refiere a grupos alquilo como se definió anteriormente, que tiene 1-3 átomos de carbono.

[0039] En algunos aspectos, la presente invención puede incluir composiciones que son eficaces en el tratamiento y/o prevención de infestaciones de endoparásitos. Dichos endoparásitos pueden incluir helmintos, tales como *Anaplocephala*, *Ancylostoma*, *Anecator*, *Ascaris*, *Capillaria*, *Cooperia*, *Dipylidium*, *Dirofilaria*, *Echinococcus*, *Enterobius*, *Fasciola*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, *Ostertagia*, *Toxocara*, *Strongyloides*, *Toxascaris*, *Trichinella*, *Trichuris* y *Trichostrongylus*.

[0040] Los helmintos también incluyen *Anaplocephala*, *Ancylostoma*, *Anecator*, *Ascaris*, *Capillaria*, *Cooperia*, *Dipylidium*, *Dirofilaria*, *Echinococcus*, *Enterobius*, *Fasciola*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, *Ostertagia*, *Toxocara*, *Strongyloides*, *Toxascaris*, *Trichinella*, *Trichuris*, y *Trichostrongylus*. U otros de la clase de helmintos, tales como de la clase de helmintos, por ejemplo, *Ancylostoma duodenale*, *Ancylostoma ceylanicum*, *Ancylostoma braziliensis*, *Ancylostoma spp.*, *Ascaris lubricoides*, *Ascaris spp.*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Bunostomum spp.*, *Chabertia spp.*, *Clonorchis spp.*, *Cooperia spp.*, *Dicrocoelium spp.*, *Dictyocaulus filaria*, *Diphyllobothrium latum*, *Dracunculus medinensis*, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Enterobius vermicularis*, *Fasciola spp.*, *Haemonchus spp.*, *Heterakis spp.*, *Hymenolepis nana*, *Hyostrongylus spp.*, *Loa Loa*, *Nematodirus spp.*, *Oesophagostomum spp.*, *Opisthorchis spp.*, *Onchocerca volvulus*, *Ostertagia spp.*, *Paragonimus spp.*, *Schistosomen spp.*, *Strongyloides fuelleborni*, *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides spp.*, *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Trichinella spiralis*, *Trichinella nativa*, *Trichinella britovi*, *Trichinella nelsoni*, *Trichinella pseudospiralis*, *Trichostrongylus spp.*, *Trichuris trichuria*, y *Wuchereria bancrofti*.

[0041] Cuando se administra por vía tópica al ganado, la eprinomectina no se metaboliza extensamente y el compuesto parental constituye el 90% de los residuos en los tejidos y más del 85% en las heces. La eprinomectina también tiene un coeficiente de leche-plasma relativamente bajo (<0,2), lo que indica una mayor separación del compuesto de la leche y hacia el plasma. Por el contrario, muchos otros compuestos de lactonas macrocíclicas pueden tener coeficientes de leche-plasma de aproximadamente 1,0. Los compuestos activos que tienen un coeficiente de leche-plasma igual a 1,0 se definen en el presente documento (y se entenderá por una persona experta en la materia) que no tienen tendencia a la separación hacia la leche o fuera de la leche. Alvinerie et al. (1999) examinaron la farmacocinética de eprinomectina en ganado lactante y concluyeron que sólo el 0,1% de la dosis total se eliminaba en la leche, que era 50 veces menor que la observada para ivermectina o moxidectina.

[0042] Cuando se administra por vía tópica eprinomectina u otros compuestos activos de lactona macrocíclica se pueden administrar en una dosis de aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal. Cuando se administra a través de inyección subcutánea, los tratamientos de lactona macrocíclica se administran habitualmente a una dosis de aproximadamente 100 µg/kg a aproximadamente 400 µg/kg. Estas dosis parecen ser suficientes para lograr eficacia contra una amplia gama de parásitos con diferentes niveles de susceptibilidad a los diversos compuestos activos de lactona macrocíclica. En algunos aspectos, las formulaciones o composiciones según la presente invención pueden contener de aproximadamente 0,5% p/v a aproximadamente 10% p/v de eprinomectina u otro compuesto activo de lactona macrocíclica; la dosis se puede suministrar al animal de aproximadamente 100 µg/kg a aproximadamente 400 µg/kg, o de aproximadamente 200 µg/kg a aproximadamente 300 µg/kg.

[0043] En otro aspecto, una dosis y volumen estándar de formulaciones según la presente invención serán eficaces en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad, afección, trastornos, o infestaciones en animales con un peso de 400 kg a 800 kg. En otras realizaciones, los animales con un peso de 600 kg y superior recibirán una dosis y volumen estándar, mientras que los animales con un peso de 599 kg a 400 kg recibirán una dosis de aproximadamente 75% del tamaño de dicha dosis estándar. La tabla 2 proporciona tamaños de dosis de muestra cuando las composiciones según la presente invención comprenden eprinomectina.

[0044] En un aspecto, las composiciones según la presente invención comprenden una lactona macrocíclica, por ejemplo, eprinomectina, un sistema de disolventes para eprinomectina, al menos un componente viral, y tensioactivos adecuados para permitir que la lactona macrocíclica y el componente viral formen una composición estable farmacéuticamente aceptable.

[0045] En un aspecto, la composición comprende eprinomectina, el sistema de disolventes comprende DMA (dimetil acetamida) y MYGLYOL 840 (diésteres de propilenglicol de ácidos caprílico y cáprico), y el componente viral deriva de rotavirus o coronavirus.

[0046] En otro aspecto, la composición comprende adicionalmente tensioactivos, tales como Span 20 (monolaurato de sorbitán), Span 80 (Monooleato de sorbitán) o TWEEN (tensioactivos de polisorbato), tal como Tween 80 (monooleato de sorbitán polioxietileno (20)), cuyos tensioactivos actúan facilitando la formación de una emulsión múltiple estable entre eprinomectina completamente disuelta, tensioactivos, y el al menos un componente viral. En algunos aspectos, las cantidades de dosis eficaces se indican en la tabla 2.

Tabla 2 – Dosis administradas de composición de eprinomectina por peso de animal

Tamaño de la dosis/concentración de eprinomectina en la formulación	Peso del animal	Dosis administrada
5 ml/3,2% p/v	400 kg	400 µg/kg
5 ml/3,2% p/v	500 kg	320 µg/kg
5 ml/3,2% p/v	600 kg	266 µg/kg
5 ml/3,2% p/v	700 kg	228 µg/kg
5 ml/3,2% p/v	800 kg	200 µg/kg

[0047] La tabla 3 proporciona tamaños de dosis de la muestra cuando las composiciones según la presente invención comprenden ivermectina.

5

Tabla 3 – Dosis administradas de composición de ivermectina por peso de animal

Tamaño de la dosis/concentración de ivermectina en la formulación	Peso del animal	Dosis administrada
3 ml/4,0% p/v	400 kg	300 µg/kg
3 ml/4,0% p/v	500 kg	240 µg/kg
3 ml/4,0% p/v	599 kg	200 µg/kg
4 ml/4,0% p/v	600 kg	266 µg/kg
4 ml/4,0% p/v	700 kg	228 µg/kg
4 ml/4,0% p/v	800 kg	200 µg/kg

[0048] En otro aspecto, las composiciones según la presente invención pueden prepararse usando las etapas que comprenden: (a) preparar un componente de solución de lactona macrocíclica; (b) preparar un componente de vacuna que es adecuado para el tratamiento de recién nacidos; y (c) mezclar los componentes (a) y (b) para producir las composiciones. En aún otra realización, las composiciones son emulsiones estables y adecuadas para la inyección en un animal, por ejemplo, un animal bovino, porcino, caprino, ovino, o equino. En algunos aspectos en los que se utiliza eprinomectina, el componente de solución de lactona macrocíclica puede comprender DMA (dimetil acetamida) y MIGLYOL (diésteres de propilenglicol de los ácidos caprílico y cáprico), los tensioactivos pueden incluir lecitina y SPAN, y el componente viral puede derivar de rotavirus o coronavirus. Las composiciones pueden comprender opcionalmente además componentes de bacterias o protistas causantes de enfermedades, por ejemplo, toxoide bacteriano de E. coli.

10

15

[0049] Las composiciones según la presente invención pueden comprender componentes según las tablas 4-8.

20

Tabla 4

	(% p/v)
Eprinomectina (ivermectina)	8% (4%)
Dimetil acetamida	15%
Miglyol 840	55%
Tensioactivos	5%
Mezcla de vacuna/adyuvante/agua	Hasta vol.

25

Tabla 5

	(% p/v)
Abamectina	4%
Dimetil acetamida	15%
Miglyol 840	55%
Tensioactivos	5%
Mezcla de vacuna/adyuvante/agua	Hasta vol.

Tabla 6

	(% p/v)
Moxidectina	4%
Dimetil acetamida	15%
Miglyol 840	55%
Tensioactivos	5%
Mezcla de vacuna/adyuvante/agua	Hasta vol.

30

Tabla 7

	(% p/v)
Eprinomectina	4%
Dimetil acetamida	15%
Miglyol 840	55%
Tensioactivos	5%
Mezcla de vacuna/adyuvante/agua	Hasta vol.

Tabla 8

	(% p/v)
Doramectina	4%
Dimetil acetamida	15%
Miglyol 840	55%
Tensioactivos	5%
Mezcla de vacuna/adyuvante/agua	Hasta vol.

5 [0050] En una realización, un componente de vacuna neonatal según la presente invención comprende los ingredientes tal como se expone en la Tabla 9.

Tabla 9 – Componente de vacuna neonatal

Ingredientes	Concentración (por dosis de 2 ml)
Rotavirus bovino, cepa UK-Compton, serotipo G6 P5 (inactivado)	¼ dosis de vacuna estimula un título de anticuerpo neutralizante de virus: > 7,7 log 2/ml (cobayas)
Coronavirus bovino, cepa <i>Medus</i> (inactivado)	1/20 dosis de vacuna estimula un título de anticuerpo de ELISA: ≥ 3,41 log 10/ml (cobayas)
Adhesina de <i>E. coli</i> (K99)	1/20 dosis de vacuna estimula un anticuerpo de ELISA (DO492): > 0,64 (cobayas)
Adyuvante	
Aceite mineral ligero/Emulsionante	1,40 ml
Hidróxido de aluminio	2,45-3,32 mg
Excipientes	
Tiomersal	0,051-0,069 mg
Otros constituyentes	
Formaldehído	≤ 0,34 mg
Tiosulfato de sodio	No administrado
Cloruro de sodio	0,85% p/v
Agua para inyección	c.s.

10 [0051] En un aspecto, un componente de solución de eprinomectina según la presente invención puede comprender los ingredientes tal como se expone en la Tabla 10 o Tabla 11.

Tabla 10 – Componente de solución de eprinomectina

Ingredientes	Concentración (mg/ml)	Cantidad por 50 ml
Eprinomectina (8%)	80	4,0 g
DMA (15%, 20% y 25%)	150/200/250	7,5/10/12,5 g
Monooleato de sorbitán (5% y 10%)	50/100	2,5/5 g
Miglyol 840	Hasta volumen final	Hasta volumen final

Tabla 11 – Componente de solución de eprinomectina

Ingredientes	Concentración (mg/ml)
Eprinomectina	80
DMA	40
Lecitina (6%)	60
SPAN 20 (1%)	10
MIGLYOL 840	Hasta volumen final

20

5 [0052] Las composiciones según la presente invención se pueden producir mediante diversos procedimientos que utilizan varios sistemas de disolventes y agentes tensioactivos. Además, la identificación de un sistema portador adecuado para producir una composición estable que comprende lactonas macrocíclicas y otros compuestos activos es un reto y no es evidente. Es bien conocido en la técnica que es muy difícil formular agentes activos de lactona
10 macrocíclica junto con ciertos otros compuestos activos debido a los diferentes requisitos de los portadores y la susceptibilidad de las lactonas macrocíclicas a la degradación en ciertos disolventes. Las avermectinas y milbemicinas, por ejemplo, son poco solubles en agua y no son compatibles con condiciones ácidas, mientras que algunos agentes antihelmínticos, tales como levamisol, son más solubles en agua y requieren condiciones de pH ácido para una estabilidad óptima (véase el documento US 2006/0128641 A1). Por ejemplo, la patente de Estados
15 Unidos No. 6.489.303 de Jancys et al. describe que las mezclas de una lactona macrocíclica y un agente antihelmíntico insoluble dieron lugar a un aumento de la tasa de degradación del agente activo de lactona macrocíclica, que requiere la adición de un exceso de antioxidante para estabilizar la mezcla. Por lo tanto, la combinación de una vacuna neonatal multicomponente compleja y una lactona macrocíclica, en una sola composición líquida que es a la vez estable y eficaz contra un amplio espectro de endoparásitos, y al mismo tiempo provoca respuestas inmunes específicas de patógenos, representa un logro significativo en el campo de la medicina veterinaria que no es ni predecible ni evidente.

20 [0053] Un desafío experimental particular fue el establecimiento de un sistema de disolventes que pudiera disolver adecuadamente las concentraciones relativamente altas de eprinomectina que se requieren para las composiciones para proporcionar una dosis efectiva a la animales. De hecho, sólo a través de los procedimientos de la invención descritos en este documento podría la alta concentración de la eprinomectina mezclarse con componentes inmunogénicos, tales como los componentes de la vacuna neonatal descritos anteriormente. Una experimentación rigurosa estableció que no se podía añadir eprinomectina a los componentes inmunogénicos a menos que la eprinomectina se disolviera primero en el componente disolvente y a continuación se combinara con los
25 componentes inmunogénicos que an lugar a emulsiones según la presente invención.

30 [0054] En una realización, las composiciones combinadas según la presente invención se pueden fabricar mediante la combinación de volúmenes iguales de componentes de solución de eprinomectina con componentes de la vacuna inmunogénica o neonatal. En una realización, aproximadamente 2 ml de componente de vacuna neonatal se combina con aproximadamente 2 ml de solución de eprinomectina para producir aproximadamente 4 ml de una composición de combinación, que también se denominará en este documento como "producto final".

35 [0055] En otra realización, se puede preparar una fase acuosa para un componente de vacuna inmunogénica o neonatal de la presente invención según las etapas que comprenden: (a) añadir agua inyectable; (b) añadir TIOMERSAL; (c) mezclar hasta que se aclare; (d) añadir tiosulfato de sodio; (e) mezclar hasta que se aclare; (f) añadir cloruro de sodio; (g) mezclar hasta que se aclare; (h) añadir formaldehído; (i) mezclar hasta que se aclare; (j) añadir concentrados de antígenos, que pueden derivarse de rotavirus y coronavirus; (k) llevar a un volumen con agua inyectable para formar la fase acuosa. En otra realización, la fase acuosa se combina con una fase oleosa, formando una emulsión, que es el componente de la vacuna inmunogénica o neonatal de la presente invención. La emulsión se puede preparar usando aceite mineral ligero u otro emulsionante adecuado y puede tener una
40 apariencia de color blanquecino.

45 [0056] En una realización, las composiciones según la presente invención pueden ser emulsiones líquidas de color blanco o blanquecina con jeringabilidad aceptable. Cualquier separación puede resuspenderse fácilmente con agitación suave, incluso cuando las composiciones están a aproximadamente 2-8°C. En una realización, el componente de vacuna se puede preparar a partir de virus y/o bacterias obtenidas originalmente en el campo, y más específicamente, pueden prepararse a partir de diversas combinaciones de coronavirus bovino, rotavirus bovino y *E. coli* obtenidos originalmente en el campo. Un experto en la técnica puede obtener fácilmente otras cepas apropiadas a partir de depositario, fuentes académicas o comerciales adecuadas.
50

55 [0057] En otra realización, las fracciones virales de la invención, los virus se cultivaron en cultivo de células de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C, o aproximadamente 37°C. A continuación, el virus se recogió y se inactivó con un agente de inactivación que no destruye las partículas de virus o antigenicidad según procedimientos estándar conocidos en la técnica.

60 [0058] La producción de las fracciones bacterianas implicaba de manera similar un proceso de crecimiento del organismo bacteriano en un medio de crecimiento para producir grandes cantidades de toxinas. A continuación, se recogen y se inactivan con un agente de inactivación. Cuando se inyectan en el animal estos "toxoides" se convierten en antígenos que el sistema inmunitario reconoce como extraños, iniciando así la producción de anticuerpos.

65 [0059] Las composiciones en formas para diversas vías de administración son contempladas por la invención. Y de nuevo, la dosis y vía de administración efectivas se determinan mediante factores conocidos, tales como la edad, sexo, peso, y otros procedimientos de cribado que son conocidos y no requieren gran experimentación. Las dosis de cada agente activo puede ser como en los documentos citados en el presente documento (o documentos de referencia o citados en los documentos citados en el presente documento).

[0060] La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

5 [0061] Sin más elaboración, se cree que un experto en la técnica puede, utilizando las descripciones anteriores, poner en práctica la presente invención en toda su extensión. Los siguientes ejemplos detallados deben interpretarse como meramente ilustrativos, y no limitativos de la descripción precedente en modo alguno. Los expertos en la técnica reconocerán rápidamente las variaciones apropiadas de los procedimientos tanto en cuanto a reactivos como a las condiciones de reacción y técnicas.

Ejemplo 1 - Producción y la calidad de varias composiciones combinadas de vacuna/lactona macrocíclica.

15 [0062] Se analizaron diversas combinaciones de componentes de disolvente de lactona macrocíclica y tensioactivos para identificar los ingredientes y procedimientos que podrían dar lugar a composiciones de combinación estables según la presente invención. Para la fase de desarrollo inicial, se utilizó una vacuna preparada comercialmente (ROTAVEC Corona, Intervet) como el componente de vacuna neonatal para la composición de formulación/combinación acabada. El componente de la solución eprinomectina se preparó según las siguientes etapas:

20 (a) añadir DMA y MIGLYOL; (b) añadir eprinomectina; (c) mezclar hasta que la solución fuera clara; (d) añadir lecitina; (e) mezclar hasta que la solución fuera clara; (f) añadir SPAN; (g) mezclar hasta que la solución fuera clara; (h) añadir MIGLYOL para llevar la solución a entre 85% y 95% del volumen de solución final; (i) calentar la solución de DMA/MIGLYOL/Eprinomectina/Lecitina/SPAN a entre 5°C y 60°C; (j) enfriar la solución hasta por debajo de 30°C y a continuación mezclar hasta que la solución fuera clara; (k) ajustar el volumen al volumen de solución final mediante la adición de MIGLYOL; y (1), filtrar asepticamente a través de un filtro de 0,22 µm.

30 [0063] El desarrollo del componente de la solución de eprinomectina planteaba retos experimentales significativos debido a la necesidad de incorporar una carga relativamente alta del principio activo. Se probaron una variedad de excipientes para llegar a la formulación preferida. Las tablas 12-15 resumen los componentes y resultados (por ejemplo, inspección visual de las composiciones de emulsión) para las series A y B de fórmulas en lotes del laboratorio.

Tabla 12 – Serie A en lote de componente de la solución de eprinomectina

	Concentración (mg/ml)	Cantidad por 50 ml
Eprinomectina (8%)	80	4,0 g
DMA (15%, 20% y 25%)	150/200/250	7,5/10/12,5 g
Monooleato de sorbitán (5% y 10%)	50/100	2,5/5 g
Miglyol 840	c.s.	c.s.

35

Tabla 13 - Serie A en lote de composición y aspecto visual

Lote	Constituyentes de componentes de concentrado de eprinomectina				Observación (2 días después de la mezcla con componente de vacuna neonatal)
	Eprinomectina (% p/v)	DMA (% p/v)	Monooleato de sorbitán (% p/v)	Miglyol 840 (% p/v)	
01	8	15	10	c.s. hasta 100	Separación de la capa de DMA y solidificar antígeno
02	8	20	10	c.s. hasta 100	Separación de la capa de DMA y solidificar antígeno
03	8	25	10	c.s. hasta 100	Separación de la capa de DMA y solidificar antígeno
04	8	15	5	c.s. hasta 100	Separación de la capa de DMA y solidificar antígeno

05	8	20	5	c.s. hasta 100	Separación de la capa de DMA y solidificar antígeno
06	8	25	5	c.s. hasta 100	Separación de la capa de DMA y solidificar antígeno
07	8	10	5	c.s. hasta 100	Separación de la capa de DMA y solidificar antígeno
08	8	10	10	c.s. hasta 100	Separación de la capa de DMA y solidificar antígeno
16	8	10	5% SMO + 5% Tween 80	c.s. hasta 100	Separación de la capa de DMA y solidificar antígeno
18	8	10	10% SPAN 20	c.s. hasta 100	Separación de la capa de DMA y solidificar antígeno

Tabla 14 – Serie B en lote de componente de la solución de eprinomectina

	Concentración (mg/ml)	Cantidad por 50 ml
Eprinomectina	80	4,0 g
DMA (15%, 10% y 8%)	150/100/80	7,5/5/4 g
Lecitina (6%)	60	3,0 g
SPan 20 (1%)	10	0,5 g
Tween 80 (2%)	20	1,0 g
Miglyol 840	c.s.	c.s.

5

Tabla 15 - Serie B en lote de composición y aspecto visual

Lote	Constituyentes de componentes de concentrado de eprinomectina				Observación (2 días después de la mezcla con componente de vacuna neonatal)
	Eprinomectina (% p/v)	DMA (% p/v)	Lecitina (% p/v)	Miglyol 840 (% p/v)	
09	8	15	5	c.s. hasta 100	Separación de la capa de DMA y solidificar antígeno
10	8	10	3	c.s. hasta 100	Aspecto físico no elegante
11	8	10	2	c.s. hasta 100	Aspecto físico no elegante
12	8	8	2	c.s. hasta 100	Aspecto físico no elegante
13	8	8	3	c.s. hasta 100	Aspecto físico no elegante
14	8	8	5	c.s. hasta 100	Aspecto físico no elegante
15	8	8	10	c.s. hasta 100	Aspecto físico no elegante
17	8	8	8	c.s. hasta 100	Aspecto físico no elegante
19	8	6	5	c.s. hasta 100	Aspecto físico no elegante

20	8	8	6% de lecitina + 2% Tween 80	c.s. hasta 100	Separación de la capa de DMA y solidificar antígeno
21	8	8	6% de lecitina + 2% Span 20	c.s. hasta 100	Buena
22	8	-	-	c.s. hasta 100 (PGMC)	Precipitado de eprinomectina
23	8	8	6% de lecitina + 1% Span 20	c.s. hasta 100	Buena
24	8	8	5% de lecitina + 2% Span 20	c.s. hasta 100	Buena
25	8	-	-	c.s. hasta 100	Precipitado de eprinomectina y solidificación
26	8	-	-	c.s. hasta 100 (Mig 810)	Precipitado de eprinomectina
27	8	-	6% de lecitina + 1% Span 20	c.s. hasta 100	Buena
28	8	-	5% de lecitina + 2% Span 20	c.s. hasta 100	Buena
29	8	8	6% de lecitina + 1% Span 20	c.s. hasta 100	Buena
30	8	8	5,5% de lecitina + 1,5% Span	c.s. hasta 100	Buena
31	8	8	5% de lecitina + 2% Span 20	c.s. hasta 100	Buena
32	8	4	6% de lecitina + 1% Span 20	c.s. hasta 100	Mejor formulación en base a la observación física
33	8	4	5,5% de lecitina + 1,5% Span	c.s. hasta 100	Buena
34	8	4	5% de lecitina + 2% Span 20	c.s. hasta 100	Buena

[0064] Además, la DMA está presente en la mayoría de las formulaciones que tenían al menos un aspecto de "buena" después de 2 días, pero varias formulaciones "buenas" no poseían DMA (véase, por ejemplo, los números 27 y 28 del lote B). La lecitina por sí misma no parecía suficiente para producir "buenas" formulaciones (véase, por ejemplo, los números 9-19 del lote B, y la adición de TWEEN a la composición que contenía lecitina no parecía aliviar el problema (véase el número 20 del lote B). La lecitina y SPAN estaban presentes en todas las formulaciones que se evaluaron como al menos "buenas" después de 2 días. De las combinaciones probadas de ingredientes experimentados, el número 32 del lote B fue la mejor formulación basada en la observación física.

5 **Ejemplo 2 - Residuos de ML en la leche y tejido de vacas lecheras lactantes después de la administración de una sola dosis de formulaciones de levamisol/eprinomectina**

15 [0065] *Objetivos del estudio:* 1) medir los residuos ML en leche y tejidos de vacas lecheras lactantes después de administrar una sola dosis de una formulación experimental de eprinomectina, ivermectina, moxidectina o doramectina combinada con una vacuna de rotavirus, coronavirus y Escherichia coli inactivados por inyección intramuscular a 0,3 y 0,4 mg lactona macrocíclica/kg de peso corporal. 2) Evaluar la irritación del tejido local de las formulaciones experimentales cuando se administraron al ganado por inyección intramuscular.

20 [0066] *Antecedentes:* Las formulaciones según la presente descripción están destinadas a administrarse a vacas mediante inyección intramuscular hasta 3 semanas antes del parto. Por lo tanto, era necesario determinar si el tratamiento con dicho producto bajo el régimen propuesto daría lugar a residuos de ML en la leche después del parto.

25 *Diseño experimental:* Las vacas lecheras se seleccionaron de acuerdo a la información resumida contemplada en la Tabla 16. Las formulaciones experimentales de cada una de las cuatro lactonas macrocíclicas se combinaron por separado con partes iguales de una vacuna registrada, Rotavec® Corona (Schering-Plough). La dosis recomendada de Rotavec® Corona es de 2 ml por animal, que se diluyó para producir 4 ml de combinación de ML/vacuna. Cada combinación de ML/vacuna contenía 40 mg/ml de lactona macrocíclica. La cantidad de ML en las formulaciones se resume en la Tabla 17.

Tabla 16 – Información resumida de vacas lactantes experimentales

Especie:	Vacas lecheras
Raza	Vacas frisonas o cruce con frisonas
Número:	33
Edad:	Abierta
Peso:	415-576 kg
Rendimiento de leche:	Suministro \geq 16,1 litros por día (promedio de 7 días)
Otros:	Sanas; sin evidencias de mastitis (RMT y palpación en el día -5)

Tabla 17 – Información resumida de vacas lactantes experimentales

5

Nombre	Principio(s) activos y concentración	CAS	Ruta	Periodo de retención
Inyección de eprinomectina	Eprinomectina 40,17 mg/ml Rotavec® Corona*	Eprinomectina 123997-26-2	Inyección IM	Carné 91 días leche 35 días
Inyección de ivermectina	Ivermectina 44,04 mg/ml Rotavec® Corona*	Ivermectina 70288-86-7		
Inyección de moxidectina	Moxidectina 40,73 mg/ml Rotavec® Corona*	Moxidectina 113507-06-5		
Inyección de doramectina	Doramectina 38,86 mg/ml Rotavec® Corona*	Doramectina 117704-25-3		
*Rotavec® Corona es una vacuna inactivada registrada (Schering-Plough, A8132) que contiene los siguientes antígenos: Coronavirus bovino (inactivo); Rotavirus bovino (inactivo); <i>Escherichia coli</i> K99 (pili)				

10

15

20

[0067] *Procedimientos:* En el día -5, se identificaron cincuenta y cuatro animales para el cribado y se comprobó la mastitis por palpación de la glándula mamaria, la visualización de las secreciones mamarias y una prueba rápida de mastitis (RMT, Immucell, Portland, Maine). Se recogieron muestras de leche individuales para el recuento de células somáticas (SCC) y se seleccionaron para el estudio treinta y tres animales que cumplían los criterios de inclusión. De los treinta y tres animales, la vaca con el promedio más alto de producción de leche diaria, según la evaluación durante un período de siete días, se asignó como control. Los restantes treinta y dos animales fueron clasificados de mayor a inferior en promedio de la producción de leche al día, durante el mismo período de tiempo, y se dividieron en cuatro bloques de ocho animales cada uno. Se generó un número aleatorio para cada animal mediante la función generadora de números aleatorios de Microsoft Excel. Dentro de cada bloque, el número aleatorio más bajo se asignó al Grupo 1, el segundo más bajo al Grupo 2 y secuencialmente hasta el Grupo 8, creando ocho grupos de cuatro animales cada uno (Tabla 18). En el día 0, las vacas se pesaron y se tomaron muestras de sangre de todos los animales en los Grupos 1 y 2 para su uso en un ensayo posterior de eprinomectina en plasma. Las muestras de sangre se almacenaron congeladas a -18°C o inferior a la espera de análisis de laboratorio. Cada animal se trató con la formulación indicada en la tasa de dosis apropiada. Las dosis se calcularon en base al peso corporal del animal en el día 0 para proporcionar aproximadamente 40 mg ML/ml. Las dosis calculadas se redondearon hasta 0,2 ml más cercano.

25

30

[0068] Las formulaciones se administraron mediante inyección intramuscular profunda en la región anterior del cuello. Los puntos de inyección estaban limpios y secos y se inspeccionaron por las lesiones antes de la inyección. Las inyecciones se administraron con una jeringa de 10 ml diferente para cada producto. Se utilizó una aguja estéril de 1½ pulgadas de calibre 18 para cada inyección. Se registró el tiempo de tratamiento. Se evaluó las evidencias del dolor en la inyección. Se observaron las vacas por las reacciones adversas a las formulaciones en aproximadamente 30 minutos, 2 y 4 horas después del tratamiento.

Tabla 18 – Grupos de tratamiento

Grupo	n	ML	Tasa de dosis nominal	Ruta
1	4	Eprinomectina	0,3 mg/kg	IM
2	4	Eprinomectina	0,4 mg/kg	IM
3	4	Ivermectina	0,3 mg/kg	IM
4	4	Ivermectina	0,4 mg/kg	IM

5	4	Moxidectina	0,3 mg/kg	IM
6	4	Moxidectina	0,4 mg/kg	IM
7	4	Doramectina	0,3 mg/kg	IM
8	4	Doramectina	0,4 mg/kg	IM
9	1	Control negativo	ND	ND

[0069] Se recogieron muestras de sangre de todos los animales de los Grupos 1 y 2 para el ensayo de eprinomectina en plasma en los días 1, 3 y 7 y se almacenaron congeladas tal como se ha descrito. Se registró el momento de la recogida de sangre. Se utilizó un equipo de prueba de la manada (De Laval) para recoger una muestra representativa de aproximadamente el 2% de todo el ordeño de cada vaca individual en el ordeño de la mañana en cada uno de los días 1 a 10 después del tratamiento, y en el ordeño de la mañana en los días 14, 21 y 35. Se decantaron las submuestras duplicadas por cada vaca en los Grupos 1-4 y 7-9 y las submuestras por triplicado se decantaron por cada vaca en los Grupos 5- 6. Cada muestra de animales tratados medía aproximadamente 30 ml. Se registraron los tiempos de inicio y final de cada ordeño de los 33 animales del estudio para dar una estimación del tiempo real de la recogida de muestras de leche.

[0070] Los animales del estudio se ordeñaron después de la manada principal. La línea de leche se lavó bien con agua fría antes de ordeñar los animales de estudio. El equipo de prueba de de la manada se limpió entre los muestreos. Se lavó "en línea" con el lavado de la planta de ordeño. Los recipientes de muestras se limpiaron adicionalmente mediante un lavavajillas. Las conexiones del muestreador se limpiaron adicionalmente por inmersión en ácido caliente, a continuación se enjuagaron. La producción de leche en cada ordeño de la que se tomaron muestras se midió y recogió.

[0071] *Observaciones:* Se observaron los animales por el comportamiento general y la conducta en los días 1-10. Los sitios de inyección se examinaron mediante inspección y palpación en el ordeño de la mañana en los días 1, 3, 7 y 14. Se describió y midió cualquier reacción visible o palpable (anchura, longitud y profundidad). Las reacciones que persistieron tras día 14 fueron reevaluados en el día 21.

[0072] La leche se mantuvo en el tanque hasta el día 35.

[0073] *Análisis:* Se refrigeró una muestra de leche de cada vaca en los Grupos 5 y 6 en cada punto de tiempo a 2-8°C y se envió (fresca, refrigerada) al laboratorio Livestock Improvement Corporation Testlink, Hamilton, Nueva Zelanda, para la cuantificación de la grasa de leche utilizando un procedimiento fluorométrico (Fossomatic). Se congelaron dos muestras de cada vaca en cada punto de tiempo a -18°C o inferior. Las muestras primarias se enviaron a Hill Laboratory, Ruakura Nueva Zelanda en estado de congelación y se ensayaron los residuos de ML pertinentes utilizando un procedimiento validado (extracción con acetonitrilo, limpieza con SPE y análisis por LC-MS/MS). Las muestras de los ordeños de los días 7, 14 y 21 se ensayaron primero. Los resultados se presentan en la Tabla 21 y en las figuras 1-7. Se mantuvieron muestras de leche en reserva hasta que se completaron los ensayos. Las muestras de sangre se centrifugaron y el plasma se decantó y se almacenó congelado a -18°C inferior. Las muestras del animal de control midieron aproximadamente 90 ml. Se analizaron muestras de control de los residuos de ML para proporcionar una comparación con la línea bse de los grupos tratados. El superávit de la leche del animal de control fue utilizado por el laboratorio para crear muestras QC fortificadas.

[0074] *Resultados:* los recuentos de células somáticas realizados sobre muestras recogidas en el día -5 promediaron 76.500 células/ml en todos los animales de estudio y oscilaron entre 18.000 y 144.000 células/ml. La producción de leche diaria promedio por vaca individual durante el período de pre-estudio de siete días promedió 17,6 l/día en todos los animales de estudio y varió de 16,1 a 19,7 l/vaca/día. Los pesos corporales medidos en el día 0 promediaron 482,1 kg en todos los animales de estudio y variaron de 415 a 576 kg. Las tasas de dosis se calcularon en 0,3 mg/kg o 0,4 mg/kg en base a una concentración de ML de 40 mg/ml. Las tasas de dosis reales (ajustadas a la concentración real de ML según se determina por el Certificado de Análisis) son como se muestra en la tabla 19.

Tabla 19: Tasas de dosis reales (mg/kg)

	Eprinomectina	Ivermectina	Moxidectina	Doramectina
Concentración (mg/ml)	40,17	44,039	40,73	38,86
Dosis prevista (mg/kg)	0,3	0,3	0,3	0,3
Dosis real (mg/kg)	0,30	0,33	0,31	0,29
Dosis prevista (mg/kg)	0,4	0,4	0,4	0,4
Dosis real (mg/kg)	0,40	0,44	0,41	0,39

[0075] Los animales se trataron entre 8:55 y 10:03 en la mañana del día 0. El ordeño de la mañana se inició a las 07:30 o partir de esa hora y concluyó a las 08:09 o antes de cada día en que se recogieron muestras durante el

período hasta el día 21. Ningún animal mostró signos de dolor a la inyección con cualquiera de las formulaciones. No se observaron efectos adversos después del tratamiento. Las mediciones de la reacción en el sitio de inyección en los días 1, 3, 7, 14 y 21 se muestran en la Tabla 22. Las reacciones fueron hinchazones firmes discretas del tejido muscular que no parecían ser dolorosas a la palpación natural. Un animal en cada uno del Grupo 1 (eprinomectina 0,3 mg/kg), Grupo 2 (eprinomectina 0,4 mg/kg) y el Grupo 6 (moxidectina 0,3 mg/kg) presentó reacciones en el sitio de inyección que persistieron al menos hasta 21 días después del tratamiento.

[0076] Discusión: La inyección intramuscular con Rotavec® Corona causó reacciones en el sitio de inyección en varios animales. La reacción en el sitio de inyección de esta naturaleza se reconoce en la etiqueta y prospectos para Rotavec® Corona, y se sugiere que se debe al aceite en la vacuna. Por lo tanto, el componente de Rotavec® Corona de la formulación de la invención probablemente contribuyó a las reacciones observadas en el estudio.

[0077] Los límites máximos de residuos (LMR) de ML para la leche bovina se presentan en tabla 20. La Agencia Europea del Medicamento (EMA) actualmente prohíbe el uso de la doramectina y la ivermectina en bovinos que producen leche para consumo humano, no se permiten residuos de estas sustancias activas. El Codex Alimentarius establece un LMR para eprinomectina, doramectina e ivermectina en la leche bovina, pero no establece un LMR para la moxidectina en la leche bovina. La ACVM de Nueva Zelanda ha establecido LMR para las cuatro sustancias activas en la leche bovina, que reflejan los LMR internacionales donde estén disponibles. Los LMR de ACVM para moxidectina definen el residuo como moxidectina en grasa de la leche, mientras que los LMR de la EMA para moxidectina definen el residuo como moxidectina en la leche entera.

Tabla 20: LMR en leche bovina (mg/kg)

ML	Definición LOQ	MRL de ACVM	Codex MRL	EMA
Eprinomectina	Eprinomectina B1a	0,02	0,02	0,02
Ivermectina	Ivermectina B1a	0,01	0,01	*
Moxidectina	Moxidectina	1,0 (en grasas de la leche)	No MRL fijado	0,04 (en leche)
Doramectina	Doramectina	0,015	0,015	*

* No debe utilizarse en bovinos que producen leche para consumo humano (es decir, <LOQ)
 * No debe utilizarse en bovinos que producen leche para consumo humano (es decir, <LOQ)

[0078] Conclusión: los residuos de eprinomectina para todos los animales de estudio estaban por debajo del LMR de 0,02 mg/kg (en un factor de diez) a los 7 días después del tratamiento y por debajo del límite de cuantificación (LOQ) a los 14 días después del tratamiento. Se detectaron residuos con medición cerca o por encima del LMR de ACVM a los 7 días después del tratamiento con doramectina, moxidectina e ivermectina. Se detectaron residuos con medición por encima del LOQ (y por lo tanto por encima de la tolerancia de EMA para doramectina e ivermectina) a los 21 días después del tratamiento con doramectina, moxidectina e ivermectina. En base a estos datos, y en relación con los LMR que se aplican en Europa, el periodo de retención para la formulación eprinomectina se estima en 7 días. Se espera que el período de retención para las variantes que contienen moxidectina, ivermectina y doramectina sea superior a 21 días y posiblemente hasta 28 días para la moxidectina.

Tabla 21. Residuo de ML por vaca para los días 7, 14 y 21 (en mg/kg)

Grupo	Residuos analizados	Vaca	Día 7	Día 14	Día 21
1	Eprinomectina B1a	379	0,0012	<0,0010	<0,0010
		421	0,0017	<0,0010	<0,0010
		432	<0,0010	<0,0010	<0,0010
		563	0,0023	<0,0010	<0,0010
2	Eprinomectina B1a	67	0,0013	<0,0010	<0,0010
		75	<0,0010	<0,0010	<0,0010
		336	0,0021	<0,0010	<0,0010
		463	<0,0010	<0,0010	<0,0010
3	Ivermectina B1a	305	0,0088	<0,0010	<0,0010
		338	0,014	0,0031	0,0010
		384	0,0068	<0,0010	<0,0010
		398	0,0052	<0,0010	<0,0010
4	Ivermectina B1a	143	0,023	0,0021	0,0011
		246	0,012	0,0011	<0,0010
		288	0,012	0,0017	<0,0010
		452	0,0093	0,0018	<0,0010
5	Moxidectina en grasa de leche	140	0,80	0,14	0,059
		342	1,1	0,26	0,080

ES 2 546 480 T3

	Moxidectina en leche entera	347	1,0	0,24	0,068	
		538	0,75	0,18	0,075	
		140	0,040	0,0078	0,0026	
		342	0,063	0,010	0,0040	
		347	0,042	0,0099	0,0031	
6	Moxidectina en grasa de leche	538	0,034	0,0079	0,0041	
		69	0,86	0,17	0,091	
		149	1,2	0,37	0,12	
		484	1,5	0,47	0,14	
	Moxidectina en leche entera	597	1,0	0,15	0,057	
		69	0,050	0,0081	0,0055	
		149	0,044	0,012	0,0037	
		484	0,056	0,015	0,0055	
	7	Doramectina	597	0,037	0,0069	0,0023
			80	0,0058	<0,0010	<0,0010
192			0,0037	0,0012	<0,0010	
243			0,0077	0,0031	0,0020	
8	Doramectina	258	0,0079	0,0015	<0,0010	
		147	0,014	0,0025	0,0010	
		319	0,0061	0,0028	0,0014	
		483	0,011	0,0025	0,0014	
9	Moxidectina en leche entera	502	0,0056	<0,0010	<0,0010	
		381	<0,0010	<0,0010	<0,0010	
		381	<0,0010	<0,0010	<0,0010	
		381	<0,0200	<0,0200	<0,0200	
		381	<0,0010	<0,0010	<0,0010	
	Doramectina	381	<0,0010	<0,0010	<0,0010	
		381	<0,0010	<0,0010	<0,0010	
		381	<0,0010	<0,0010	<0,0010	
		381	<0,0010	<0,0010	<0,0010	
		381	<0,0010	<0,0010	<0,0010	

Tabla 22. Mediciones de la reacción en el sitio de inyección

Grupo	Tratamiento	Vaca	Día 1	Día 3	Día 7	Día 14	Día 21
1	EPN 0,3 mg/kg	379	40x50x5	70x110x10	50x50x15	30x30x10	20x20x10
		421	60x40x5	-	-	-	-
		432	-	-	-	-	-
		563	-	-	-	-	-
		Recuento	0	1	1	1	1
2	EPN 0,4 mg/kg	67	80x110x10	80x110x10	90x110x15	70x90x15	70x70x10
		75	70x110x10	40x50x5	-	-	-
		336	-	-	-	-	-
		463	-	-	-	-	-
		Recuento	2	2	1	1	1
3	IVN 0,3 mg/kg	305	-	-	-	-	-
		338	-	-	-	-	-
		384	40x50x5	-	-	-	-
		398	-	-	-	-	-
		Recuento	1	0	0	0	0
4	IVN 0,4 mg/kg	143	-	-	-	-	-
		246	-	-	-	-	-
		288	-	-	-	-	-
		452	-	-	-	-	-
		Recuento	0	0	0	0	0
5	Moxidectina 0,3 mg/kg	140	-	-	-	-	-
		342	-	-	-	-	-
		347	-	-	-	-	-
		538	-	-	-	-	-
		Recuento	0	0	0	0	0
6	Moxidectina 0,4 mg/kg	69	120x130x1	90x90x10	80x80x10	60x60x10	80x60x15
		149	-	-	-	-	-
		484	-	-	-	-	-
		597	-	-	-	-	-

ES 2 546 480 T3

		Recuento	1	1	1	1	0
7	Doramectina 0,3 mg/kg	80	40x50x5	-	40x40x5	-	-
		192	40x50x10	20x20x5	10x10x5	-	-
		243	-	-	-	-	-
		258	-	-	-	-	-
		Recuento	2	1	2	0	0
8	Doramectina 0,4 mg/kg	147	-	10x10x5	-	-	-
		319	-	-	-	-	-
		483	-	-	-	-	-
		502	-	-	-	-	-
		Recuento	-	-	-	-	-
9	Sin inyección	381	-	-	-	-	-
		Recuento	0	0	0	0	0

[0079] La presente invención se describe adicionalmente mediante las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Composición inyectable para prevenir o controlar infecciones o enfermedades parasitarias, bacterianas o virales en ganado, comprendiendo la composición:
 - 5 (a) una cantidad eficaz de al menos un componente viral de rotavirus o coronavirus inactivado,
 - (b) una cantidad eficaz de al menos un compuesto de lactona macrocíclica, en el que la lactona macrocíclica es abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina o moxidectina,
 - (c) un portador adecuado que comprende un sistema de disolventes farmacéuticamente aceptables para el compuesto de lactona macrocíclica, comprendiendo dicho sistema de disolventes dimetil acetamida (DMA), Myglyol 840 (diésteres de propilenglicol de los ácidos caprílico y cáprico), Span 20 (monolaurato de sorbitán) y lecitina, y
 - 10 (d) un conservante.
2. Composición, según la reivindicación 1, en la que la lactona macrocíclica es eprinomectina.
- 15 3. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un toxoide bacteriano de *E. coli*.
4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el volumen de una dosis individual es eficaz para el tratamiento de vacas que pesan de 400 kg a 800 kg.
- 20 5. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que un volumen de dosis libera al menos 200 µg/kg de lactona macrocíclica a vacas que pesan de 400 kg a 800 kg y en la que la composición comprende eprinomectina o ivermectina.
- 25 6. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición comprende abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina o moxidectina a una concentración de entre el 2% y el 6% p/v de la composición.
7. Composición, según la reivindicación 6, en la que la concentración es del 3% al 5%.
- 30 8. Composición, según la reivindicación 7, en la que la concentración es del 3,5% al 4,5% o el 4%.
9. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el volumen de dosis previene que la dosis de compuesto de lactona macrocíclica supere una dosis de 400 µg/kg.
- 35 10. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se administra a animales como muy tarde 10 días antes de obtener leche que está destinada al consumo humano.
11. Composición, según la reivindicación 9, en la que la composición se administra como muy tarde 8 días o 9 días.
- 40 12. Procedimiento para preparar la composición, según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
 - a. preparar un componente de solución de lactona macrocíclica mediante la disolución completa de la lactona macrocíclica en un sistema de disolventes farmacéuticamente aceptables;
 - b. preparar un componente de vacuna neonatal; y
 - 45 c. mezclar los componentes de (a) y (b) para producir la composición, según la reivindicación 1, en el que la lactona macrocíclica es abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina o moxidectina, y en el que dicho sistema de disolventes comprende dimetil acetamida (DMA), Myglyol 840 (diésteres de propilenglicol de los ácidos caprílico y cáprico), Span 20 (monolaurato de sorbitán) y lecitina.
- 50 13. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que la etapa de preparación de un componente de solución de lactona macrocíclica comprende las etapas de:
 - a. añadir DMA y Myglyol 840;
 - b. añadir eprinomectina;
 - c. mezclar hasta que la solución sea clara;
 - 55 d. añadir lecitina;
 - e. mezclar hasta que la solución sea clara;
 - f. añadir Span 20;
 - g. mezclar hasta que la solución sea clara;
 - h. añadir Myglyol 840 para llevar la solución hasta un volumen de solución final entre el 85% y el 95%;
 - 60 i. calentar la solución de DMA/Myglyol 840/eprinomectina/lecitina/Span 20 entre 45°C y 55°C;
 - j. enfriar la solución hasta por debajo de 35°C o por debajo de 30°C y a continuación mezclar hasta que la solución sea clara;
 - k. ajustar el volumen a un volumen de solución final mediante la adición de Myglyol 840; y
 - 65 l. filtrar de manera aséptica a través de un filtro de 0,22 µm para preparar el componente de solución de eprinomectina.

14. Composición combinada para utilizar en la prevención o control de enfermedades parasitarias en vacas preñadas y enfermedades virales en terneros neonatales, conteniendo dicha composición al menos un componente viral inactivado que comprende rotavirus o coronavirus, junto con una cantidad eficaz de al menos un compuesto de lactona macrocíclica, un portador farmacéuticamente aceptable y un conservante,
- 5 en la que la lactona macrocíclica es abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina o moxidectina, y en la que el portador farmacéuticamente aceptable comprende un sistema de disolventes farmacéuticamente aceptables para la lactona macrocíclica, comprendiendo el sistema de disolventes dimetil acetamida (DMA), Miglyol 840 (diésteres de propilenglicol de los ácidos caprílico y cáprico), Span 20 (monolaurato de sorbitán) y lecitina, y en la que la composición es para la administración parenteral a una vaca preñada.
- 10
15. Composición combinada para utilizar, según la reivindicación 14, en la que el componente viral inactivado comprende además un toxoide bacteriano de *E. coli*.
- 15
16. Composición combinada para utilizar, según la reivindicación 14, en la que cada vaca recibe una dosis que contiene entre 200 µg/kg y 400 µg/kg del compuesto de lactona macrocíclica.

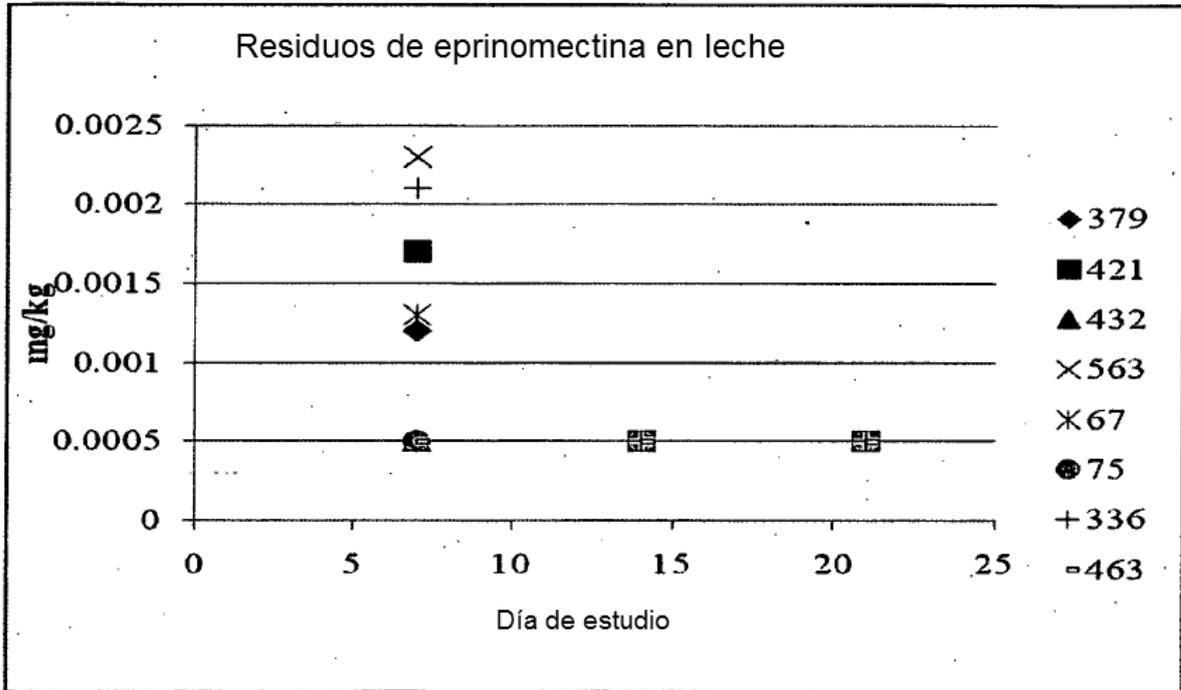


Figura 1

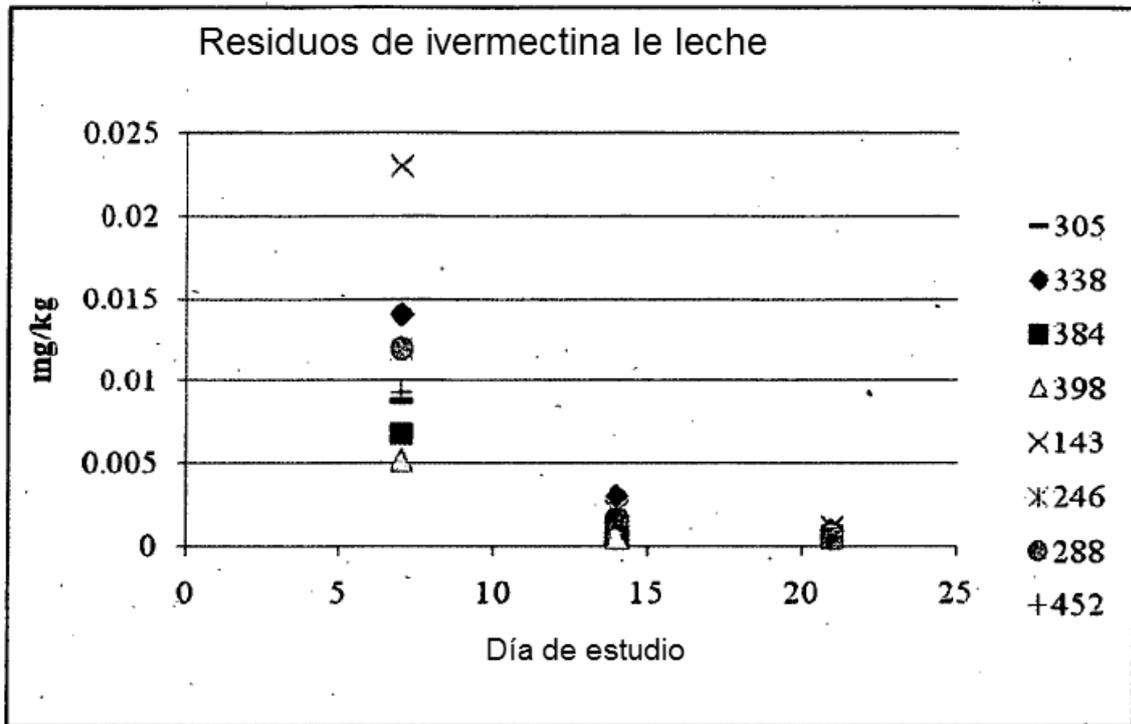


Figura 2

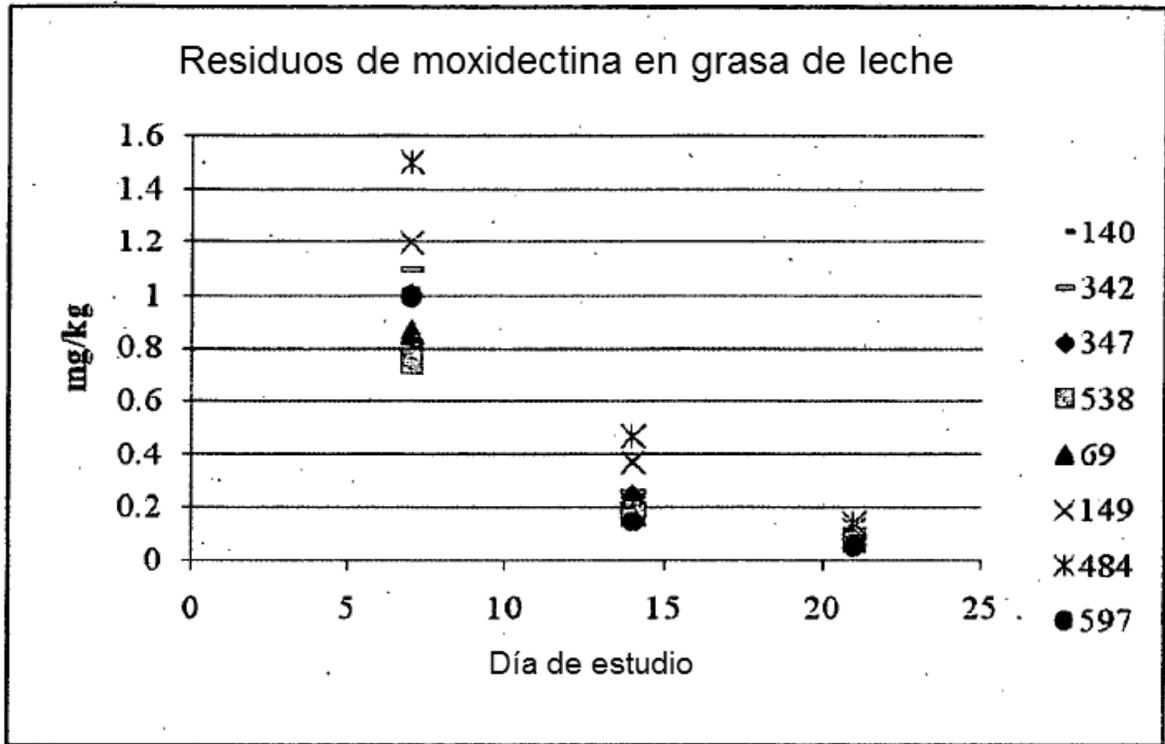


Figura 3

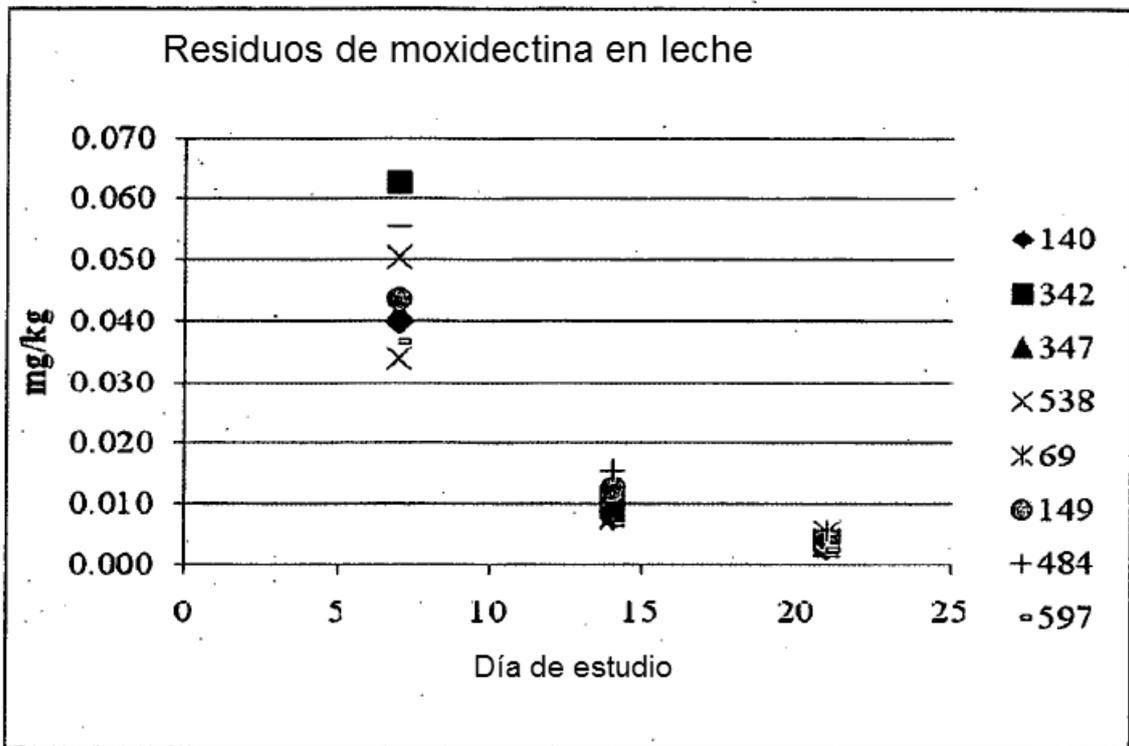


Figura 4

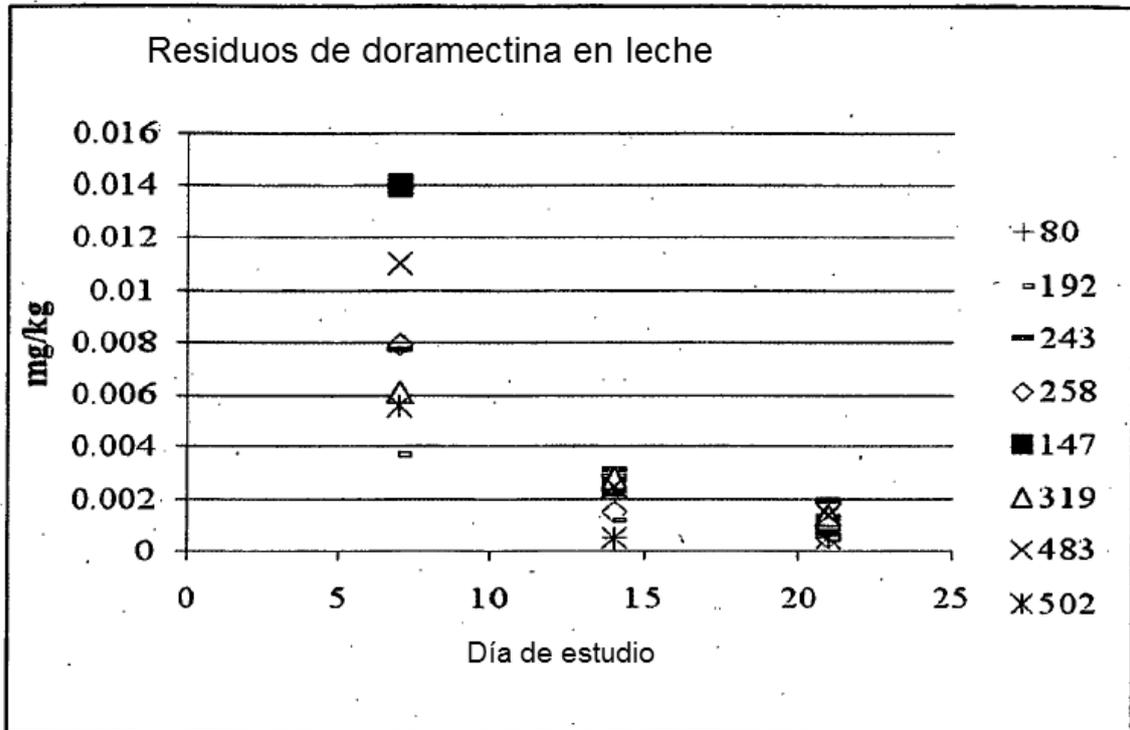


Figura 5

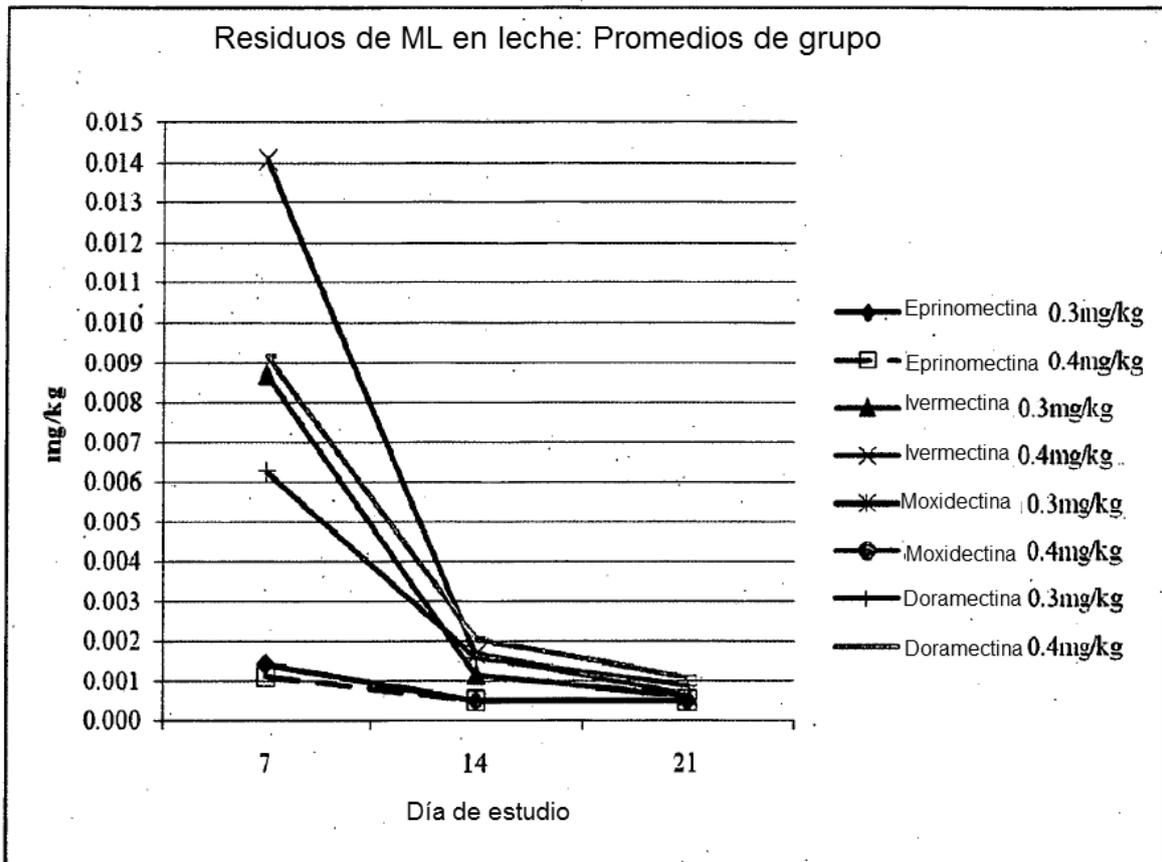


Figura 6

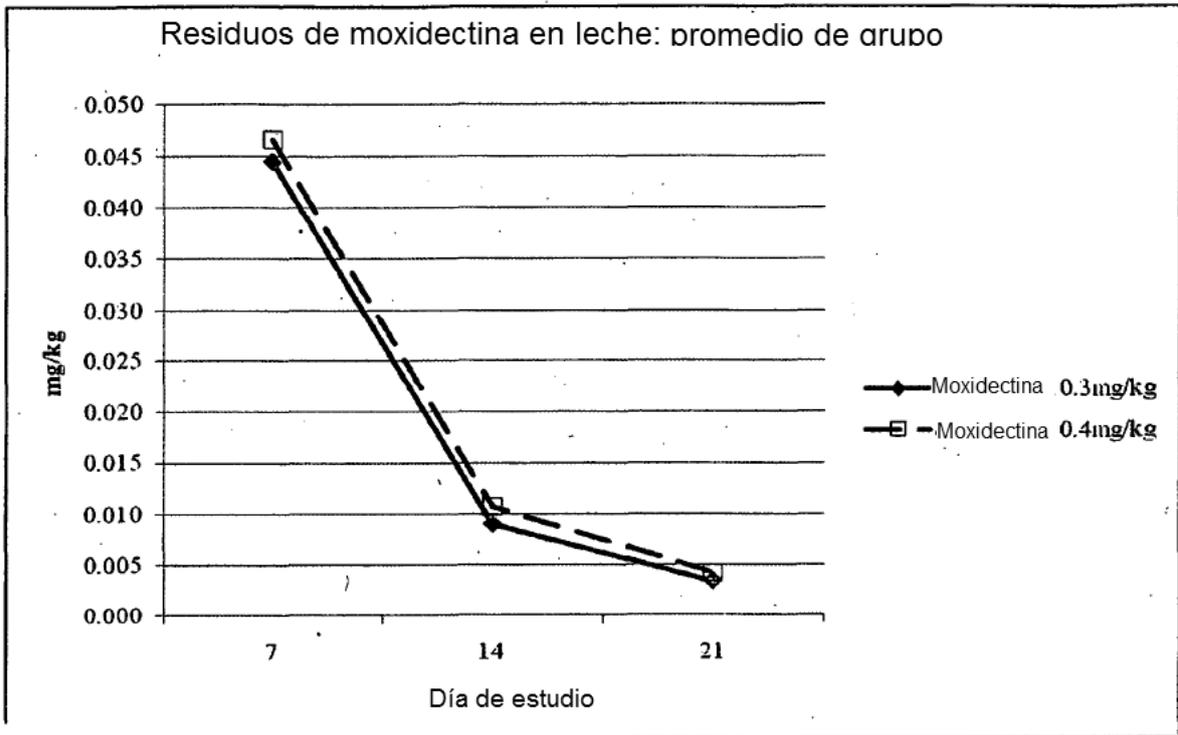


Figura 7