

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 815**

51 Int. Cl.:

A01N 43/80 (2006.01)

A61K 31/42 (2006.01)

A01P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2014 PCT/EP2014/076959**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15086551**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2014 E 14809838 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 3079474**

54 Título: **Uso antiparasitario de compuestos de isoxazolina**

30 Prioridad:

10.12.2013 EP 13196539

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

17.02.2020

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**WILLIAMS, HEIKE;
ZOLLER, HARTMUT y
HECKEROTH, ANJA REGINA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 742 815 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

Uso antiparasitario de compuestos de isoxazolina

5 Esta invención se refiere a la profilaxis de infestaciones por parásitos en animales.

Los compuestos de isoxazolina son conocidos en la técnica y se sabe que los compuestos de esta clase poseen una excelente actividad contra las infestaciones por parásitos, como las garrapatas y las pulgas.

10 Los compuestos de isoxazolina y su uso como antiparasitarios se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE. UU. US 2007/0066617 y en las solicitudes de patente internacional WO 2005/085216, WO 2007/079162, WO 2009/002809, WO 2009/024541, WO 2009/003075, WO 2010/070068 y WO 2010/079077.

15 Un compuesto de isoxazolina preferido es [5-(3,5-diclorofenil)-5-trifluorometil-4,5-dihidroisoxazol-3-il]-2-metil-N-[(2,2,2-trifluoro-etilcarbamoil)-metil]-benzamida (CAS RN 864731-61-3-USAN fluralaner).

La actividad adulticida (destruccion) de las pulgas de los antiparasitarios en perros infestados es importante, pero representa solo una parte del programa de control de pulgas necesario para el control efectivo de la poblacion de pulgas.

20 La poblacion adulta del perro representa solo aproximadamente el 5 % de la infestacion total por pulgas en una vivienda, mientras que el otro 95 % de la poblacion consiste en etapas juveniles de pulgas: huevos, larvas y pupas en el entorno del hogar del perro [Dryden MW. Host association, on host longevity and egg production of Ctenocephalides felis. Vet Parasitol 1989, 34:117-122].

25 Estas etapas juveniles (maduracion) representan una fuente de reinfestacion para el perro a medida que se convierten en adultas.

30 Se ha registrado un control altamente efectivo de las poblaciones de pulgas ambientales con insecticidas de aplicacion topica [Dryden MW, Payne PA, Smith V, Heaney K, Sun F. Efficacy of indoxacarb applied to cats against the adult cat flea, Ctenocephalides felis, flea eggs and adult flea emergence. Parasites & Vectors 2013, 6:126] pero no se cree que sea una caracteristica de los insecticidas administrados sistemicamente [Dryden MW, Payne PA, Smith V, Ritchie LD, Allen L. Evaluation of the Ovicidal Activity of Lufenuron and Spinosad on Fleas' Eggs from Treated Dogs. Intern J Appl Res Vet Med. 2012, 10 (3): 198-204].

35 La prevencion de la reproduccion de las pulgas (desarrollo de etapas juveniles de pulgas a etapas maduras (adultas) por compuestos de isoxazolina no se ha descrito en la tecnica anterior.

40 Los compuestos de isoxazolina para su uso en la presente invencion son

4-[5-(3,5-diclorofenil)-5-trifluorometil-4,5-dihidroisoxazol-3-il]-2-metil-N-[(2,2,2-trifluoro-etilcarbamoil)-metil]-benzamida (CAS RN 864731-61-3-USAN fluralaner),

45 (Z)-4-[5-(3,5-diclorofenil)-5-trifluorometil-4,5-dihidroisoxazol-3-il]-N-[(metoxiimino)metil]-2-metilbenzamida (CAS RN 928789-76-8),

4-[5-(3,5-diclorofenil)-5-(trifluorometil)-4H-isoxazol-3-il]-2-metil-N-(tietan-3-il)benzamida (CAS RN 1164267-94-0) que se divulgó en el documento WO2009/0080250,

50 4-[5-[3-Cloro-5-(trifluorometil)fenil]-4,5-dihidro-5-(trifluorometil)-3-isoxazolil]-N-[2-oxo-2-[(2,2,2-trifluoroetil)amino]etil]-1-naftalenocarboxamida (CAS RN 1093861-60-9, USAN-afoxolaner) que se divulgó en el documento WO2007/079162 y

55 5-[5-(3,5-diclorofenil)-4,5-dihidro-5-(trifluorometil)-3-isoxazolil]-3-metil-N-[2-oxo-2-[(2,2,2-trifluoroetil)amino]etil]-2-tiofenocarboxamida (CAS RN 1231754-09-8) que se divulgó en el documento WO2010/070068.

La presente invencion se refiere a dichos compuestos de isoxazolina o una sal o solvato de los mismos para prevenir la reinfestacion de animales por pulgas mediante la administracion sistémica de cantidades subterapéuticas de dicho compuesto de isoxazolina al animal. En una realizacion preferida, dicha administracion sistémica es la administracion oral, en otra realizacion, la administracion topica, en otra realizacion, la administracion parenteral (inyectable, especialmente subcutánea).

En una realizacion preferida, la invencion se refiere a dicho uso en el que dicho compuesto es fluralaner.

65 En una realizacion preferida, la invencion se refiere a dicho uso de los compuestos de isoxazolina en el que el plasma sanguíneo del animal comprende concentraciones de compuesto de isoxazolina entre 1,5 y 25 ng/ml.

En una realización, la invención se refiere a dicho uso de los compuestos de isoxazolina el que el compuesto de isoxazolina se administra a animales que están expuestos a etapas juveniles de pulgas. En una realización preferida, el animal es un perro o un gato.

5

En una realización, la administración reduce los signos de dermatitis alérgica por pulgas.

En una realización, el compuesto de isoxazolina, especialmente fluralaner, se usa para prevenir la reinfestación de animales por pulgas administrando a un animal infestado con pulgas una dosis de un compuesto de isoxazolina como se define en la reivindicación 1, suficiente para inhibir el desarrollo de la descendencia de tales pulgas en etapas adultas

10

En una realización preferida, la dosis del compuesto de isoxazolina es suficiente para alcanzar concentraciones plasmáticas en la sangre entre 1,5 y 25 ng/ml. En una realización, el compuesto de isoxazolina, especialmente fluralaner, se usa para prevenir el desarrollo de estadios juveniles de pulgas en un ambiente animal mediante la administración a un animal infestado con pulgas de una dosis de un compuesto de isoxazolina como se define en la reivindicación 1 suficiente para inhibir el desarrollo de estadios juveniles de pulgas en estadios adultos que se originan a partir de pulgas, que han sido expuestos a dicho compuesto de isoxazolina.

15

El método de esta invención comprende mezclas racémicas, por ejemplo, cantidades iguales de los enantiómeros. Además, el método de esta invención incluye compuestos que están enriquecidos en comparación con la mezcla racémica en un enantiómero. También se incluyen los enantiómeros esencialmente puros.

20

Cuando se enriquece enantioméricamente, un enantiómero está presente en mayores cantidades que el otro, y el grado de enriquecimiento puede definirse mediante una expresión de exceso enantiomérico ("ee"), que se define como $(2x-1) \cdot 100\%$, donde x es la fracción molar del enantiómero dominante en la mezcla (por ejemplo, un ee del 20 % corresponde a una relación 60:40 de enantiómeros). Preferiblemente, las composiciones de Fórmula 1 tienen al menos un exceso enantiomérico del 50 %; más preferiblemente al menos un exceso enantiomérico del 75 %; aún más preferiblemente al menos un exceso enantiomérico del 90 %; y lo más preferiblemente al menos un exceso enantiomérico del 94 % del isómero más activo. De particular interés son las realizaciones enantioméricamente puras del isómero más activo.

25

30

Las isoxazolininas pueden comprender centros quirales adicionales. El método de esta invención comprende mezclas racémicas así como configuraciones estereo enriquecidas y esencialmente puras en estos centros quirales adicionales. Las isoxazolininas pueden existir como uno o más isómeros conformacionales debido a la rotación restringida alrededor del enlace amida. El método de esta invención comprende mezclas de isómeros conformacionales. Además, el método de esta invención incluye compuestos que están enriquecidos en un conformador en relación con otros. La referencia al compuesto de isoxazolina en esta memoria descriptiva incluye enantiómeros, sales y solvatos, así como sus N-óxidos que pueden producirse por métodos convencionales.

35

40

Los compuestos de isoxazolina, como el fluralaner, tienen un potente efecto inhibitorio sobre la reproducción de pulgas que se puede ver tanto en resultados experimentales *in vitro* como *in vivo*. Como se muestra en el ejemplo, las bajas concentraciones de fluralaner (50,0 ng/ml y 25,0 ng/ml) lograron un control completo de la oviposición (100 %), porque las pulgas que sobrevivieron 4-5 días de administración a estas concentraciones no produjeron ningún huevo (Tabla 2)

45

En el ejemplo, se lograron altas tasas de control de la oviposición incluso a concentraciones de isoxazolina sub-insecticida que incluyen 99,6 % (12,5 ng/ml) y 80,6 % (6,25 ng/ml). Se demostró que el fluralaner no afecta la eclosión de las larvas, ya que se observó la eclosión en casi todos los grupos de pulgas que podían poner huevos (Tabla 3). Sin embargo, el desarrollo de la pupa se redujo fuertemente (85,1 % a 12,5 ng/ml, 88,7 % a 6,25 ng/ml) lo que indica que la exposición al fluralaner tiene un potente efecto larvicida (Tabla 4). El mismo efecto continuó hasta el 100 % de control de la emergencia del adulto a 12,5 ng de fluralaner/ml (Tabla 5).

50

La potente eficacia *in vitro* para controlar la reproducción de las pulgas fue respaldada por el estudio *in vivo* del tratamiento de perros con fluralaner oral en comparación con los perros de control no tratados en un entorno doméstico simulado. El ambiente doméstico fue creado al permitir que los perros tuvieran acceso a un área de ropa de cama alfombrada y a sitios atrayentes de pulgas durante el mes anterior al tratamiento con fluralaner. Esto dio como resultado un entorno con una población de pulgas próspera que incluye todas las etapas de desarrollo antes de la administración del tratamiento, lo que lleva a una mayor carga de pulgas en los perros de control no tratados durante toda la duración del estudio. Después del tratamiento, las poblaciones de pulgas se controlaron eficazmente en los perros tratados con fluralaner (Bravecto™), con eficacia al 100 % o cerca del 100 % durante las 12 semanas posteriores al tratamiento (Tabla 6).

55

60

Se ha registrado un control altamente efectivo de las poblaciones de pulgas ambientales con insecticidas aplicados tópicamente que tienen actividad de contacto contra las pulgas, el cual no se logra de manera confiable con los insecticidas administrados sistémicamente previamente evaluados.

65

“Profilaxis” o “Prevención” significa que una nueva infestación del animal con parásitos, especialmente pulgas, se previene al reducir o inhibir la generación de descendencia de los parásitos, por ejemplo, destruyendo o inhibiendo el desarrollo de etapas juveniles. Por lo tanto, se evita una reinfestación de los perros por pulgas adultas que se originan en etapas juveniles desarrolladas en el entorno doméstico infestado (por ejemplo, ropa de cama, alfombras).

En general, la composición para su uso en la invención contendrá una cantidad sub-insecticida, esto significa una cantidad que está por debajo de la cantidad “efectiva”, que conduce a concentraciones plasmáticas/séricas que destruyen el 100 % de las pulgas adultas.

Las concentraciones subinsecticidas (o subterapéuticas) (plasma o suero) son concentraciones que están por debajo del nivel esperado para proporcionar un efecto de eliminación de pulgas adulta completo e instantáneo (100 % dentro de las 48 horas posteriores a la administración del compuesto de isoxazolina). En una realización, la cantidad sub-insecticida (dosis) es del 10 % al 20 % de la cantidad efectiva mínima para destruir el 100 % de las pulgas adultas dentro de las 48 horas posteriores a la administración del compuesto de isoxazolina. En otra realización, la cantidad sub-insecticida (terapéutica) está entre el 20 y el 50 %, en otra realización entre el 50 y el 70 % de la cantidad efectiva mínima.

Las cantidades (dosis) normalmente efectivas para compuestos de isoxazolina están entre 1 mg/kg de peso corporal del animal tratado y 40 mg/kg de peso corporal.

La “administración sistémica” es una administración en un sitio alejado de un sitio en el que reside al menos una parte de los parásitos objetivo. Con la administración sistémica, al menos una parte del compuesto de isoxazolina alcanza el parásito objetivo a través del torrente sanguíneo del receptor animal, otros fluidos corporales (fluidos linfáticos) y/o tejidos (por ejemplo, piel o tejido adiposo). Esto contrasta con la “actividad de contacto” donde la superficie del cuerpo del parásito está directamente expuesta al compuesto de isoxazolina. Normalmente, el parásito ingiere la isoxazolina administrada sistémicamente junto con la sangre del animal receptor, otros fluidos corporales y/o tejido. La administración sistémica se puede lograr de varias formas, por ejemplo, administración oral, parenteral o tópica en la que el compuesto de isoxazolina se absorbe por vía transdérmica.

En algunas realizaciones, el compuesto de isoxazolina se administra sistémicamente a través de una ruta oral en una forma de dosificación unitaria, como, por ejemplo, una cápsula blanda o dura, una píldora, un polvo, gránulos, un comprimido (por ejemplo, un comprimido masticable), una pasta, una solución, una suspensión (acuosa o no acuosa), una emulsión (aceite en agua o agua en aceite), un elixir, un jarabe, un bolo, un baño o a través del alimento o agua de bebida del animal receptor. Como alternativa, la administración oral se puede realizar a través del alimento o agua de bebida del animal receptor, por ejemplo, se puede dispersar íntimamente en la alimentación regular del animal receptor, usarse como aderezo o en forma de gránulos o líquido que se agrega a la alimentación final.

Una forma de administración oral es una forma farmacéutica, por ejemplo, una composición masticable, como un comprimido masticable. Los ejemplos de comprimidos masticables que comprenden compuestos de isoxazolina de fórmula (I) se describieron en los documentos WO2013/150052 y WO2013/150055. La composición de los comprimidos masticables que se divulga en los ejemplos de estos documentos se incorpora como referencia. Otros comprimidos masticables alternativos se describen en el documento WO2013/119442.

Las composiciones veterinarias orales en forma de un “comprimido masticable”, a veces denominadas “composiciones masticables blandas” o “*soft chew*”, son generalmente cómodos para administrar a ciertos animales, particularmente gatos y perros, preferiblemente perros, y pueden usarse efectivamente para administrar medicamentos veterinarios a estos animales.

Un “comprimido masticable”, “*soft chew*” o “producto farmacéutico masticable blando” significa una dosis unitaria farmacéutica que es sólida a temperatura ambiente y que después de la administración oral es blando para masticar por el animal y que es funcionalmente masticable porque el producto tiene cierta textura plástica durante el proceso de masticación en la boca. Dichos comprimidos masticables tienen una textura blanda que es similar a la de trocitos pequeños de carne molida. El comprimido masticable o *soft chew* comprende un vehículo y otros ingredientes no activos.

Como alternativa (o adicionalmente) el compuesto de isoxazolina puede administrarse por vía tópica utilizando una formulación transdérmica (es decir, una formulación que pasa a través de la piel). Como alternativa (o adicionalmente), la composición puede administrarse sistémicamente por vía tópica a través de la mucosa. Como alternativa (o adicionalmente) la composición de isoxazolina se puede administrar por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, implante (por ejemplo, implante subcutáneo), infusión, bolo, etc.

Los animales pueden recibir una composición farmacéutica que comprende un compuesto de isoxazolina como se

definió anteriormente cada 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses o recibir una dosis anual, semestral, trimestral, bimensual, mensual, semanal o diaria. Se prefiere una administración de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención cada 3 meses o trimestralmente.

5 En general, el compuesto de isoxazolina se puede administrar a todas las especies de animales que tienen infestación de parásitos.

10 El destinatario del producto puede ser ganado, por ejemplo, ovejas, vacas, cerdos, cabras o aves de corral; un animal de ensayo de laboratorio, por ejemplo, cobaya, rata o ratón; o un animal de compañía, por ejemplo, perro, gato, conejo, hurón o caballo. Especialmente preferido es el uso en animales de compañía, por ejemplo, perros, gatos o hurones, preferiblemente perros o gatos, especialmente perros.

15 Una "infestación" se refiere a la presencia de parásitos en números que representan un riesgo de molestias o daños a humanos o animales. La presencia puede estar en el medio ambiente (por ejemplo, en la ropa de cama de los animales), en la piel o el pelaje de un animal, etc.

20 A menos que se indique lo contrario, cuando la infestación está dentro de un animal (por ejemplo, en la sangre u otros tejidos internos), el término infestación pretende ser sinónimo del término "infección", ya que ese término generalmente se entiende en la técnica.

25 Las cantidades de isoxazolina que se administran sistémicamente se eligen para mantener un nivel plasmático o sérico de isoxazolina (especialmente en el caso de que el compuesto de isoxazolina sea fluralaner) de 1,5 a 25 ng/ml. Se prefiere un nivel de isoxazolininas en suero/plasma, especialmente fluralaner, de entre 5 y 12,5 ng/ml, especialmente 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,13 ng/ml o 1,56 ng/ml.

30 Las pulgas incluyen, por ejemplo, *Ctenocephalides* spp., tales como pulgas de perro (*Ctenocephalides canis*) y pulgas de gato (*Ctenocephalides felis*); *Xenopsylla* spp., como las pulgas de rata orientales (*Xenopsylla cheopis*); *Pulex* spp., como las pulgas humanas (*Pulex irritans*); pulgas de erizo (*Archaeopsylla erinacei*); y pulgas de aves (*Ceratophyllus gallinae*).

35 La presente invención permite prevenir la reinfestación de animales por pulgas administrando a un animal infestado con pulgas una dosis de un compuesto de isoxazolina como se define en la reivindicación 1 suficiente para inhibir el desarrollo de las etapas juveniles de pulgas en etapas adultas que se originan a partir de pulgas adultas (es decir, su descendencia) que han sido expuestas a dicho compuesto de isoxazolina.

En dicho método, el compuesto de isoxazolina es preferiblemente fluralaner.

40 En dicho método, la dosis es suficiente para alcanzar concentraciones en plasma sanguíneo del compuesto de isoxazolina entre 1,5 y 25 ng/ml.

En tal método, el animal es un perro o un gato.

En dicho método, la administración sistémica es una administración oral.

45 Como alternativa, en dicho método la administración sistémica es una administración tópica.

Como alternativa, en dicho método la administración sistémica es una administración parenteral.

50 Ejemplos

Ejemplo 1 Exposición a la alimentación por membrana *in vitro* para evaluar la reproducción de pulgas

55 Un método de alimentación por membrana [Wade SE, Georgi JR. Survival and reproduction of artificially fed cat fleas, *Ctenocephalides felis* Bouché (Siphonaptera: Pulicidae). J Med Entomol 1988, 25: 186-190] fue modificado para evaluar el impacto de la exposición al fluralaner en la reproducción de las pulgas. Se preparó sangre de oveja defibrinada en una serie de diluciones con fluralaner para obtener concentraciones entre 50,0 y 0,09 ng/ml. Estas soluciones de prueba se prepararon dos veces y cada preparación se probó por duplicado, dando como resultado un total de 4 réplicas por concentración, junto con un control de disolvente negativo de fluralaner (una concentración de disolvente equivalente a la de la solución de prueba de fluralaner más concentrada) y un control sin tratar.

60 Las pulgas adultas no alimentadas (*C. felis*; 20 machos y 20 hembras) se colocaron en una unidad de plástico que luego se cerró con una tapa de gasa. Una rejilla dentro de la unidad de plástico dividía la unidad en 2 cámaras, una cámara superior para la alimentación de las pulgas y una cámara inferior para la recolección de los huevos [8]. Las preparaciones de sangre de prueba o control (2 ml) se colocaron en un tubo de vidrio cerrado con membrana artificial que a continuación se colocó en la unidad de plástico como fuente de alimento. Las unidades de alimentación se incubaron (38 °C y 60 % de HR) durante 10 días. Las preparaciones de sangre de prueba y control

negativas se prepararon en el momento y se intercambiaron (en los días 1, 3, 5 y 8) para permitir la alimentación continua de las pulgas. Las pulgas se transfirieron a unidades de plástico frescas los días 5 y 8 para facilitar la recolección de huevos. Los huevos recolectados se mezclaron con el medio de alimentación para pulgas y se incubaron (28 °C y 80 % de HR) en la oscuridad durante 22 (± 3) días para permitir el desarrollo de las pulgas. Los parámetros registrados fueron la supervivencia de pulgas, el control de la oviposición, la incubabilidad del huevo, el control de las pupas, control de emergencia de las pulgas y la inhibición de la reproducción.

Resultados

Impacto en la reproducción de las pulgas después de la exposición a la alimentación por membrana *in vitro*

La exposición a la alimentación a concentraciones de 50 ng de fluralaner/ml tuvo como resultado una supervivencia de las pulgas del 78,1 % (día 2), 20,0 % (día 3), 8,7 % (día 4) y 1,2 % (día 5). Con 25 ng/ml, las tasas de supervivencia de las pulgas fueron del 90,6 % (día 2), 67,5 % (día 3), 31,9 % (día 4) y 11,3 % (día 5). Las tasas de supervivencia de las pulgas aumentaron con concentraciones más bajas (Tabla 1). Las concentraciones de 50 y 25 ng de fluralaner/ml lograron un control completo de la oviposición (100 %), porque las pulgas que sobrevivieron a 4 a 5 días de alimentación a estas concentraciones no produjeron ningún huevo. A concentraciones más bajas de 12,5 y 6,25 ng de fluralaner/ml, la oviposición se controló en un 99,6 % y 80,6 %, respectivamente (Tabla 2). Fluralaner no afectó la eclosión de las larvas, ya que se observó eclosión en casi todos los grupos de pulgas que pudieron poner huevos (Tabla 3). El desarrollo de la pupa se redujo fuertemente (85,1 % con 12,5 ng de fluralaner/ml, 88,7 % con 6,25 ng de fluralaner/ml), lo que indica que la exposición a fluralaner tiene un potente efecto larvicida (Tabla 4). El mismo efecto continuó hasta el 100 % de control de la emergencia del adulto con 12,5 ng de fluralaner/ml (Tabla 5).

Tabla 1. Supervivencia de las pulgas después de alimentarse con sangre que contiene fluralaner en concentraciones sub-insecticidas.

Fluralaner (ng/ml)	Supervivencia de las moscas (%)						
	Día de exposición ^a						
	2	3	4	5	8	9	10
50,0	78,1	20,0	8,7	1,2	0	0	0
25,0	90,6	67,5	31,9	11,3	0	0	0
12,5	100	100	67,5	38,9	21,7	17,9	12,3
6,25	100	100	97,5	92,8	85,0	73,1	69,7
3,13	100	100	98,7	97,8	83,1	79,5	78,8
1,56	100	100	99,4	99,1	93,9	92,9	90,3
0,78	100	100	100	100	100	100	100
0,39	100	100	100	100	100	100	98,7
0,19	100	100	100	100	100	100	100
0,09	100	100	100	100	100	100	100

^a No se realizaron recuentos de pulgas en los días de exposición 6 y 7.

Tabla 2. Control de la oviposición de las pulgas después de alimentarse con sangre que contiene fluralaner en concentraciones sub-insecticidas.

Fluralaner (ng/ml)	Control de la oviposición (%)						
	Día de exposición ^a						
	3	4	5	8	9	10	Media ^b
50,0	100	100	100	NA,	NA,	NA,	100
25,0	100	100	100	NA,	NA,	NA,	100
12,5	99,6	100	100	98,9	99,1	100	99,6
6,25	82,6	85,9	81,3	79,9	67,5	86,4	80,6
3,13	32,0	35,7	43,1	70,5	59,9	62,0	50,5
1,56	0	0	17,3	49,8	30,1	29,2	21,1

(continuación)

Fluralaner (ng/ml)	Control de la ovoposición (%)						
	Día de exposición ^a						
	3	4	5	8	9	10	Media ^b
0,78	8,7	3,0	13,8	12,5	0	18,5	9,4
0,39	6,72	22,8	23,2	23,8	0	20,3	16,1
0,19	0	5,1	21,0	15,1	0	13,9	9,2
0,09	0	11,3	10,9	16,7	0,3	8,1	7,9

^a No se realizaron recuentos de huevos en los días de exposición 6 y 7.
^b Media aritmética
NA: no aplicable porque se destruyeron todas las pulgas (Tabla 1)

Tabla 3. Emergencia de larvas de pulgas de huevos de pulgas parentales alimentadas con sangre que contiene fluralaner en concentraciones sub-insecticidas

Fluralaner (ng/ml)	Emergencia larval						
	Día de exposición ^a						
	3	4	5	8	9	10	
50,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
25,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12,5	no	NA	NA	sí	sí	NA	NA
6,25	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
3,13	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
1,56	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
0,78	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
0,39	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
0,19	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
0,09	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí

^a No se realizó una evaluación de la aparición de larvas en los días de exposición 6 y 7.
NA: no aplicable porque las pulgas se destruyeron o no pusieron huevos (Tabla 1 y Tabla 2)

5

Tabla 4. Control del desarrollo pupal a partir de huevos de pulgas parentales alimentadas con sangre que contiene fluralaner en concentraciones sub-insecticidas.

Fluralaner (ng/ml)	Desarrollo pupal (%)						
	Día de exposición ^a						
	3	4	5	8	9	10	Media ^b
50,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
25,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12,5	100	NA	NA	55,2	100	NA	85,1
6,25	90,2	92,4	87,3	86,4	89,9	86,0	88,7
3,13	66,3	68,9	61,7	70,3	62,1	57,4	64,5
1,56	35,3	36,3	34,6	35,5	41,6	27,2	35,1
0,78	7,5	11,4	16,7	10,8	11,9	14,5	12,1
0,39	9,8	0	1,5	3,3	6,3	0,8	3,6
0,19	8,8	0,2	6,8	0	2,7	0	3,1

(continuación)

Fluralaner (ng/ml)	Desarrollo pupal (%)						
	Día de exposición ^a						
	3	4	5	8	9	10	Media ^b
0,09	9,1	4,5	1,4	0	5,9	2,9	4,0

^a No se realizaron recuentos de pupas en los días de exposición 6 y 7.
^b Media aritmética
NA: no aplicable porque las pulgas se destruyeron o no pusieron huevos (Tabla 1 y Tabla 2)

Tabla 5. Control de la aparición de pulgas adultas después de que las pulgas parentales se alimentaron con sangre que contiene fluralaner a concentraciones sub-insecticidas.

5

Fluralaner (ng/ml)	Control de emergencia de pulgas adultas (%)						
	Día de exposición ^a						
	3	4	5	8	9	10	Media ^b
50,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
25,0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12,5	NA	NA	NA	100	NA	NA	100
6,25	29,2	0	0	9,2	30,8	0	11,5
3,13	4,4	11,9	3,2	8,6	7,5	0	5,9
1,56	0	0	0	10,2	0	0	1,7
0,78	3,8	0	0	3,1	1,8	0	1,5
0,39	0	0	0	1,6	5,2	0	1,1
0,19	4,6	0	1,3	0,8	6,7	0	2,2
0,09	1,1	0,5	0	0	0	0	0,3

^a No se realizaron recuentos de pulgas adultas en los días de exposición 6 y 7
^b Media aritmética
NA: no aplicable porque las pulgas se destruyeron o no pusieron huevos (Tabla 1, Tabla 2 y Tabla 4).

Ejemplo 2 Estudio *in vivo* en perros para evaluar la eficacia del control de pulgas en un entorno doméstico simulado

10 **Procedimientos del estudio**

Veinte perros sanos de raza mestiza machos y hembras ≥ 12 semanas de edad fueron alojados en corrales individuales. Diez perros por grupo fueron asignados al azar para recibir o un comprimido masticable de fluralaner (Bravecto™) o ningún tratamiento. Cada corral contenía la mitad inferior de un trasportín para perros forrado con alfombra como ropa de cama. Antes del tratamiento, cada perro se infestó dos veces (pretratamiento 28 y 21 días) con 100 adultos no alimentados de *C. felis* para establecer una población de pulgas antes del tratamiento en cada perro. Se agregaron medios antipulgas a la alfombra 4 semanas antes de la fecha de tratamiento y, posteriormente, semanalmente durante el resto del estudio para fomentar el desarrollo de una población activa y en desarrollo de pulgas juveniles en cada corral. El día del tratamiento, los perros del grupo tratado recibieron fluralaner a una dosis cercana a 25 mg/kg de peso corporal mediante administración oral. Los comprimidos masticables se administraron colocándolos en la parte posterior de la cavidad oral sobre la lengua para iniciar la deglución. Los perros en el grupo de control negativo permanecieron sin tratamiento.

25 Se realizaron recuentos de pulgas en todos los perros 1 día antes del tratamiento, 1 día después del tratamiento y luego cada 7 días hasta la finalización del estudio 84 días después. Todas las pulgas vivas recuperadas se mantuvieron y se volvieron a utilizar para infestar el perro después de completar el recuento de peines. Cada perro fue además infestado con 50 pulgas adultas sin alimentar recién emergidas en los días 22, 50 y 78 para simular la infestación natural después del tratamiento.

30

Análisis estadístico

5 Cada perro individual era la unidad experimental y los datos de cada punto de tiempo del recuento de pulgas se analizaron por separado. Los datos del recuento de pulgas se transformaron [$Y = \log_e(x + 1)$] y se analizaron mediante un modelo lineal mixto que incluye el tratamiento como efecto fijo y el bloqueo como efecto aleatorio. El ajuste de Kenward-Rogers se utilizó para determinar el grado de libertad del denominador. Se utilizó una prueba de dos colas dentro del modelo lineal mixto para la comparación entre los grupos de tratamiento y se consideraba significación estadística cuando $P \leq 0,05$. El principal software utilizado para el análisis fue el SAS versión 9.3.

10 La eficacia se calculó utilizando las medias aritméticas y geométricas con la fórmula de Abbott:
 Eficacia (%) = $100 \times (M_C - M_T) / M_C$, donde M_C era la media aritmética o geométrica del total de pulgas adultas vivas en perros no tratados y M_T la media aritmética o geométrica del total de pulgas adultas vivas en perros tratados.

Resultados

15 No se observaron acontecimientos adversos en ningún perro tratado con fluralaner (Bravecto™) después de la administración. La media del recuento de pulgas (aritmética/geométrica) en perros de control no tratados fue de 52,3/26,4 pulgas antes del día de tratamiento (día -1) y en el intervalo de 5,1/1,8 a 57,1/40,6 pulgas después del tratamiento. La media del recuento de pulgas (aritmética/geométrica) en perros tratados con fluralaner fue de 35,0/14,1 pulgas antes del tratamiento, 0/0 pulgas en los días 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 63, 77 y 84, y 0,1/0,1 pulgas los días 49, 56 y 70 después del tratamiento. En comparación con el control, estos recuentos fueron significativamente diferentes ($P \leq 0,021$) en todos los días de recuento posteriores al tratamiento. Los resultados de eficacia calculados fueron del 100 % o muy cercanos al 100 % en todos los puntos de tiempo posteriores al tratamiento (Tabla 6).

25 **Tabla 6. Eficacia de control de pulgas en perros tratados (25 mg de fluralaner/kg de peso corporal) en comparación con perros no tratados en un entorno doméstico simulado.**

Día post-tratamiento	Media del número de pulgas (aritmética / geométrica)		Eficacia ^a (%)	Valor p
	Grupo de control	Grupo tratado		
-1	52,3/26,4	35,0/14,1	N/A	N/A
1	12,8/6,0	0/0	100/100	0,001
7	5,1/1,8	0/0	100/100	0,021
14	7,1/2,7	0/0	100/100	0,012
21	16,5/4,1	0/0	100/100	0,011
28	53,2/24,8	0/0	100/100	0,000
35	44,1/15,7	0/0	100/100	0,000
42	42,6/10,8	0/0	100/100	0,002
49	48,7/20,6	0,1/0,1	99,8/99,7	0,000
56	57,1/40,6	0,1/0,1	99,8/99,8	0,000
63	42,3/25,6	0/0	100/100	0,000
70	30,0/16,2	0,1/0,1	99,7/99,6	0,000
77	21,9/12,3	0/0	100/100	0,000
84	40,7/33,2	0/0	100/100	0,000

^a Eficacia calculada a partir de la media aritmética/geométrica del recuento de pulgas.
 NA: no aplicable

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de isoxazolina seleccionado de

- 5 4-[5-(3,5-diclorofenil)-5-trifluorometil-4,5-dihidroisoxazol-3-il]-2-metil-N-[(2,2,2-trifluoro-etilcarbamoil)-metil]-benzamida;
 (Z)-4-[5-(3,5-diclorofenil)-5-trifluorometil-4,5-dihidroisoxazol-3-il]-N-[(metoxiimino)metil]-2-metilbenzamida;
 4-[5-(3,5-diclorofenil)-5-(trifluorometil)-4H-isoxazol-3-il]-2-metil-N-(tietan-3-il)benzamida;
 10 4-[5-[3-Cloro-5-(trifluorometil)fenil]-4,5-dihidro-5-(trifluorometil)-3-isoxazolil]-N-[2-oxo-2-[(2,2,2-trifluoroetil)amino]etil]-1-naftalenocarboxamida y
 5-[5-(3,5-diclorofenil)-4,5-dihidro-5-(trifluorometil)-3-isoxazolil]-3-metil-N-[2-oxo-2-[(2,2,2-trifluoroetil)amino]etil]-2-tiofenocarboxamida.

15 para su uso en la prevención de la reinfestación de animales por pulgas, en el que se administra sistémicamente al animal una dosis del compuesto de isoxazolina suficiente para alcanzar concentraciones plasmáticas en sangre de entre 1,5 y 25 ng/ml.

2. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto es fluralaner o afoxolaner.

20 3. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho compuesto es fluralaner.

4. El compuesto para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el animal es un perro o un gato.

25 5. El compuesto para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la administración sistémica es una administración oral.

6. El compuesto para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la administración sistémica es una administración tópica.

30 7. El compuesto para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la administración sistémica es una administración parenteral.