

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

WID INDUSTRIA 1/11 PCT/NOV2015/0000000000

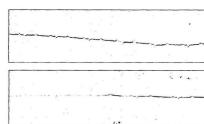


Figura 1

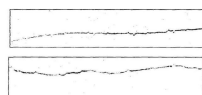


Figura 2

1	Título de la Invención (200 caracteres o espacios máximos)		
TILMICOSINA DE ACCIÓN PROLONGADA MEJORADA Y EL USO DE LA MISMA EN EL TRATAMIENTO DEL COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO (CRB) Y EN EL PERIODO DE LA VACA SECA			
2	Datos del Solicitante / Titular		
Nombre:	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO	Dirección Electrónica:	notificaciones@clarkemodet.com.co
Dirección:	9° Piso de la Torre de Rectoría Ciudad Universitaria S/N, C.P. 04510	Domicilio/País de constitución:	MEXICO - DISTRITO FEDERAL - MEXICO
Identificación:			

☐ CEDULA DE CIUDADANIA
☒ EMPRESA EXTRANJERA
☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ NIT

Número:

1036350-

3

Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social

Tipo

Identificación

1. UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO NN 1036350

4

Datos del Inventor

Nombre:

Héctor Salvador
SUMANO
LOPEZ,

**Dirección
Electrónica:**

notificaciones@clarkemodet.com.co

Dirección:

Cerrada de
Hidalgo No.
129 - 2 Colonia
San Pablo
Tepetiapa, C.P.
04620,

**Domicilio/País de
constitución:**

MEXICO - DISTRITO FEDERAL -
MEXICO

Identificación:

☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT
☐ PASAPORTE ☒ No Aplica

Número:

-

5

Inventor(es)

Apellidos - Nombres

Domicilio

1. SUMANO LOPEZ, Héctor Salvador MEXICO
2. GUTIÉRREZ OLVERA, Lilia MEXICO

6

Datos Inventor(es)

	País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	MEXICO	DISTRITO FEDERAL	MEXICO	Cerrada de Hidalgo No. 129 - 2 Colonia San Pablo Tepetiapa, C.P. 04620,
2.	MEXICO	DISTRITO FEDERAL	MEXICO	Cerrada de Hidalgo No. 129 - 2 Colonia San Pablo Tepetiapa, C.P. 04620,
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO	Dirección Electrónica:	notificaciones@clarkemodet.com.co
Dirección:		CARRERA 11 NO. 86-53, PISO 6	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación:				
☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE				
Número:		66783790-		
Presentación de Poder				
Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/MX2015/000031	Fecha Solicitud:	18/02/2015
Número Publicacion:		WO 2015/126233	Fecha Publicacion:	27/08/2015
9	Declaraciones de prioridad		☒ SI ☐ NO	
1.	(33) País de origen MEXICO	Codigo del país MX	(31) No. Solicitud MX/a/2014/001907	(32) Fecha 18/02/2014

10	Reivindicaciones		
Número reivindicaciones:		21	Pago Reivindicaciones: Si
11	Reducción de tasas.		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
12	Documentos Anexos		
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☒ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☐ Listado de secuencias ☒ Artes finales 12 x 12 cm ☐ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos			

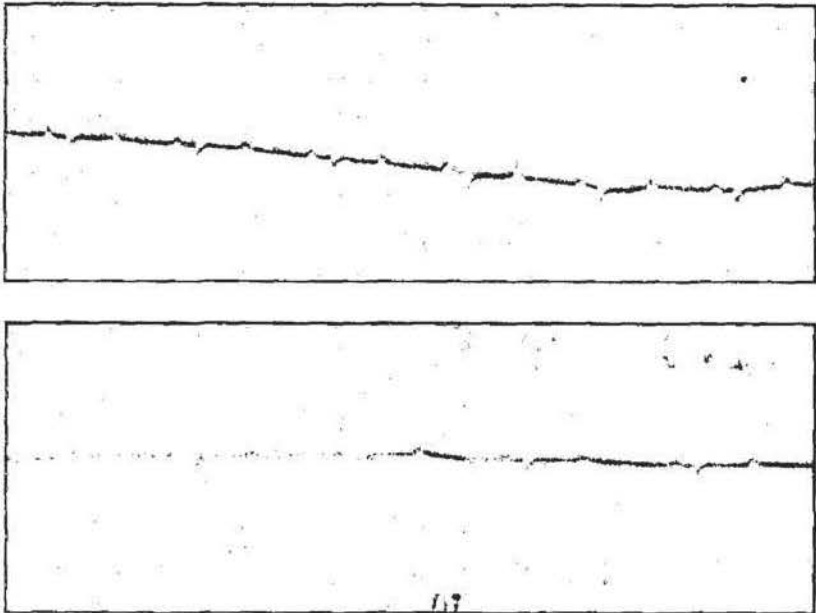


Figura 1

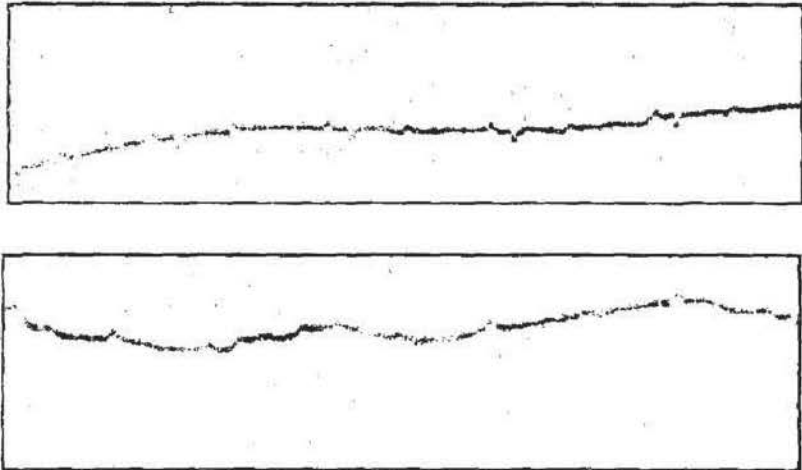


Figura 2

**TILMICOSINA DE ACCION PROLONGADA MEJORADA Y EL USO DE LA MISMA EN
EL TRATAMIENTO DEL COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO (CRB) Y EN EL
PERIODO DE LA VACA SECA**

5

CAMPO DE APLICACIÓN

La presente invención está relacionada con los principios y técnicas utilizadas en la Industria Farmacéutica Veterinaria para el desarrollo de nuevas composiciones farmacéuticas para fabricar medicamentos que contribuyan a la salud animal, y más específicamente, está relacionada con una formulación que contiene tilmicosina de acción prolongada mejorada, el método para fabricar la misma y su uso en la prevención y tratamiento del Complejo Respiratorio Bovino (CRB) y en el periodo de la vaca seca.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La ganadería bovina representa una de las actividades económicas importantes del país. Sin embargo, la productividad de esta ha disminuido en los últimos años y uno de los factores causantes de esto son las escasas actividades sanitarias realizadas en las unidades ganaderas. En el caso de los bovinos, existe una variedad de enfermedades que los afectan, destacando en este sentido el denominado "Complejo Respiratorio Bovino" (CRB) entidad que ocasiona grandes pérdidas económicas. El impacto económico no solo se basa en la morbilidad y mortalidad, también se debe a la reducción de variables productivas de los bovinos especializados en la producción de leche, carne y doble propósito.

Las principales pérdidas que ocasiona el CRB son: gastos* de medicación de animales enfermos, mantenimiento de bovinos en recuperación, disminución en la ganancia diaria de peso, afectación del rendimiento final, disminución en la producción de carne y leche y muerte de los bovinos.

Se ha determinado que los trastornos respiratorios en los bovinos se deben a causas multifactoriales, en las que coexisten e interactúan dos grupos de factores, los predisponentes y los determinantes o desencadenantes. Los predisponentes o

estresantes incluyen una variedad de factores relacionados al manejo y al medio ambiente como el transporte, hacinamiento y alimentación defectuosa, en donde dichas condiciones ambientales adversas crean las condiciones óptimas para la proliferación bacteriana. Por otro lado, las causas determinantes se refieren a los agentes infecciosos virales y bacterianos quienes en última instancia desencadenan el cuadro clínico.

En el CRB participan diversos virus como son los virus de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), Diarrea Viral Bovina (BVD), Parainfluenza 3 (PI3) y Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB), que dañan al aparato respiratorio y predisponen a las infecciones bacterianas. Las bacterias comúnmente involucradas son *Pasteurella haemolytica* Tipo A 1 y su leucotoxina, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus* (actualmente *Hitophilus somni*), agentes que normalmente se identifican en el árbol respiratorio como causa final de la neumonía y muerte de los bovinos.

Siendo el CRB una de las tres principales causas de desecho en bovinos; adquiere relevancia su diagnóstico y tratamiento oportuno para evitar la muerte y cronicidad del problema respiratorio con la consecuente disminución en la producción de los animales, los gastos en medicamentos y costos médicos, así como la muerte de animales.

En el CRB, el tratamiento está orientado a la sintomatología presente en el animal mediante el uso combinado de agentes terapéuticos que actúen como mucolíticos, broncodilatadores, antiinflamatorios y antibacterianos seleccionados de manera empírica o mediante un antibiograma. En los casos leves, el tratamiento por 3 días mínimo resuelve el cuadro clínico; mientras que en los casos graves de neumonía con focos de consolidación, el tratamiento con antibióticos resulta comúnmente ineficiente. En casos comprobados del CRB, en donde hay interacción virus-bacteria, lo primordial es el control a través del uso de bacterinas y/o vacunas que permitan alcanzar una buena protección en los becerros en la etapa crítica desde su nacimiento hasta los 3 meses, y a menudo se aplican tratamientos de manera metafiláctica.

Por otro lado, es sabido que todos los bovinos productores de leche en el mundo requieren de un periodo de descanso antes de que se de el parto y se inicie un nuevo periodo de lactación, en donde a dicho periodo de descanso se le conoce como "periodo de la vaca seca" o "periodo seco". Este "periodo de la vaca seca" sirve para una
5 recuperación del desgaste por la lactación que están dejando atrás y para tener suficientes reservas metabólicas (incluyendo Ca, P, Mg, etc.) para un parto y amamantamiento de la cría. Durante esta fase se pretende que el animal recupere el tejido mamario y descanse para conseguir un correcto desarrollo de la lactación posterior, además de potenciar el crecimiento del feto.

10 Dicho "periodo de la vaca seca" dura de 30 a 60 días previos al parto y el periodo más usado en el mundo es de 45 días y a los tratamientos que se den en este periodo se le conoce como terapia(s) de secado. Durante el inicio del "periodo seco" y hacia el final del mismo, hay estrés en la vaca. Al inicio ya no se le puede ordeñar y hay tensión por la pérdida de la rutina y la presión intramamaria durante la reabsorción del material lácteo,
15 como hacia el final de dicho "periodo seco".

Asimismo, durante el inicio del "periodo seco", las bacterias Gram-positivas pueden generar mastitis clínicas y/o subclínicas, en particular el *Staphylococcus aureus*. Durante el periodo terminal de la seca, se presenta más comúnmente el *Streptococcus uberis* como causa más común de infección. Mientras que las
20 infecciones por bacterias Gram-negativas son muy raras.

Las infecciones clínicas y sobre todo las subclínicas mencionadas, generan mastitis clínicas durante las primeras 8 semanas de lactación y luego la incidencia tiende a bajar. Para tratar de controlar esto se administran tubos intramamarios de medicamentos antibacterianos. Se sabe que debe hacerse esto sólo una vez antes de
25 iniciar el "periodo seco" y se desea que el preparado dure el mayor tiempo posible dentro de la glándula en dicho "periodo seco". Sin embargo, se identifican las siguientes desventajas para el tratamiento antibacteriano en el "periodo seco" por vía intramamaria:

- No se conoce el tiempo de estancia de los preparados dado que no se pueden obtener muestras de leche, ya que se interrumpiría el proceso fisiológico del "secado".

- Muchos preparados tienen un diseño farmacéutico pobre en términos de difusión al tejido mamario desde la cisterna mamaria.

- Los preparados intramamarios se deben aplicar con técnica aséptica, deseando no haber lacerado el conducto de la teta.

- Si se requiriera un refuerzo durante la fase final del "periodo seco", la aplicación intramamaria perjudica más de lo que pudiera ayudar.

La alimentación y manejo durante el "período de la vaca seca" o "período seco" han sido durante mucho tiempo los aspectos más descuidados de los rebaños de las vacas lecheras. Hoy en día se sabe que un mal manejo o una alimentación defectuosa derivan en una gran cantidad de trastornos metabólicos que se manifiestan como problemas patológicos diversos, tales como el síndrome de la vaca caída, fiebre de la leche cetosis, desplazamientos de abomaso, retención placentaria, laminitis, dificultad al parto, dificultad productiva por malas salidas a celo, disminución de la producción, entre otros.

Para el tratamiento de las enfermedades infecciosas respiratorias de tipo bacteriano, en lo que respecta a los antibióticos, en México se cuenta con las siguientes opciones:

a) Florfenicol + flumixina-meglubina que se administra por vía subcutánea (SC) a dosis de 40 mg/kg y 2.2 mg /kg de florfenicol y flunixinina, respectivamente y que de acuerdo con el fabricante logra concentraciones terapéuticas por 96 horas. Se recomienda solo 1 dosis y excepcionalmente 2 dosis.

b) Tilmicocina a la dosis de 10 mg/kg por la vía subcutánea (SC) en dosis única, máximo dos con un intervalo de 72 horas.

c) Ceftiofur cristalizado, vía de administración subcutánea (SC) en la base de la oreja que contribuye a una mejor calidad de carne. Dosis de 14 mg/kg con una concentración útil de 7 a 10 días.

d) Enrofloxacin-LA, la cual se aplica a dosis de 7.5 a 10 mg/kg logrando 5 concentraciones terapéuticas hasta por 72 horas de acuerdo con el fabricante.

e) Tulatromicina que es un nuevo macrólido de acción prolongada. Es una solución antimicrobiana estéril inyectable, lista para usarse en una sola dosis que contiene 100mg de tulatromicina/ml en una formulación acuosa con propilenglicol. Permite intervalos de dosificación de 14 a 21 días posterior a su aplicación vía 10 subcutánea (SC). Se administra en el cuello a una dosis de 2.5 mg de tulatromicina/kg por peso corporal.

Haciendo referencia específica a la tilmicosina, ésta es un antibiótico macrólido, sintetizado a partir de la tilosina, que ha estado disponible en los Estados Unidos desde 1992 y desarrollado exclusivamente para ser usado en medicina veterinaria.

15 La actividad antibacteriana de los macrólidos, es producida por la inhibición de la síntesis de proteínas por la unión del antibiótico en el ARN23S de la subunidad 50S ribosomal de los microorganismos procariotas. Los macrólidos inhiben la translocación del ARN de transferencia desde el punto aceptor del aminoácido, lo que impide la formación de un nuevo enlace peptídico, impidiendo así la síntesis de nuevas proteínas 20 en la célula microbiana. Los macrólidos se unen a los ribosomas mitocondriales pero son incapaces de atravesar la membrana mitocondrial y por lo tanto no producen supresión de la medula ósea de los mamíferos.

La tilmicosina tiene actividad *in-vitro* contra organismos gram-positivos y mycoplasmas y es activa contra ciertos organismos gram-negativos, tales como 25 *Histophilus sommi* (*Haemophilus somnus*), *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica*. La actividad antibacteriana de los macrólidos, es producida por la inhibición de la síntesis de proteínas por la unión del antibiótico en el

ARN23S de la subunidad 50S ribosomal de los microorganismos procariotas. Además, los macrólidos ejercen importante actividad antiinflamatoria y de inmunomodulación.

En el estado de la técnica se encuentran diversos documentos relacionados con la tilmicosina, tal es el caso de la Patente China No. CN 103083281 (A) que se refiere a la
5 preparación de una micro-cápsula de liberación lenta de tilmicosina con recubrimiento entérico y a un método de preparación de la misma y pertenece al campo de las preparaciones de tilmicosina. La preparación de la micro-cápsula de liberación lenta de tilmicosina con recubrimiento entérico proporcionada por la invención comprende una capa de núcleo interior y una capa de revestimiento, en donde la capa de núcleo interior
10 comprende tilmicosina en polvo y un material auxiliar; el material auxiliar comprende uno o más de uno de ácido esteárico, monoestearato de glicerina, alcohol estearílico, triglicérido saturado, monoglicérido y parafina, y la capa de recubrimiento está hecho de uno o más de uno de ftalato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropil-metil celulosa, resina acrílica, acetato ftalato de polivinilo y acético succinato de hidroxipropil
15 metilcelulosa. El método de preparación comprende las siguientes etapas: llevar a cabo un recubrimiento primario sobre el polvo de tilmicosina y el material auxiliar; llevar a cabo un segundo recubrimiento mediante el uso de los materiales de la capa de recubrimiento, y secar para obtener el producto final. De acuerdo con la invención, la tilmicosina se recubre mediante el uso de materiales de alto polímero y la micro-cápsula de tilmicosina
20 recubierta es insoluble en medio ácido y se disuelve lentamente en medio alcalino de la capa entérico, tal que se logra el propósito de liberación lenta y el tiempo de acción de la tilmicosina se prolonga.

Por otro lado, la Patente China No. CN101249069 (A) se refiere al campo de la tecnología de preparación de medicamentos veterinarios para aves de corral y el ganado,
25 específicamente a un inyectable de tilimocosina de acción prolongada y un método de preparación del mismo. Actualmente, se ha informado de la existencia de preparaciones de tilmicosina (tales como soluciones acuosas, comprimidos e inyecciones comunes) que

tienen efecto de ganancia de peso en pollos de grupos de tratamiento de altas dosis de tilmicosina y de grupos de tratamiento de tratamiento de dosis media de tilmicosina, pero no tienen ninguna diferencia significativa con los grupos de tratamiento de tilosina, y la tilmicosina se superior a la tilosina en menor dosis y un efecto anti-infeccioso notable. La

5 invención proporciona una inyección de tilmicosina de acción prolongada y un método de preparación de la misma. La inyección de tilmicosina de acción prolongada se prepara mediante la disolución del fármaco de tilmicosina a granel en alcohol anhidro y aceite de ricino, eventualmente mezclando, subempacar y esterilizar. La inyección de tilmicosina de acción prolongada tiene las ventajas del proceso de preparación simple, de bajo costo y

10 el notable efecto curativo, y es un nuevo medicamento veterinario para aves de corral y el ganado, con una alta seguridad y eficacia, bajo precio y menor toxicidad.

Asimismo, la Patente China No. CN101416978 (A) describe un método de preparación de una inyección de tilmicosina de larga acción, que comprende las siguientes etapas: (1) se pesan con exactitud 10g a 20g de tilmicosina y se ponen en un

15 vaso de precipitados; (2) se ponen de 25ml a 75ml de propilenglicol en una probeta y se vierten en la tilmicosina, agitar, poner en baño maría y disolver completamente con una temperatura de 60° C, y luego se añade agua que es utilizada usada inyecciones; (3) el valor de pH se regula con ácido fosfórico para ser de 5.5 a 6.5; (4) el volumen se lleva a 100ml, y (5) después filtrar y encapsular, la esterilización se lleva a cabo a una

20 temperatura de 100°C durante 30 min., y el producto final se obtiene después de enfriar, inspeccionar ligeramente, imprimir y empacar. El medicamento veterinario tiene las ventajas de las técnicas avanzadas de producción, preparación estable, larga vida de almacenamiento, un efecto rápido, largo período de vida media inferior desde 2 días a 3 días, un uso seguro, efecto terapéutico exacto, aplicaciones conveniente y similares.

25 Como puede verse, en el estado de la técnica se conocen diversos fármacos para prevenir y tratar las enfermedades infecciosas de tipo bacteriano; sin embargo, todos ellos presentan ciertas desventajas tales como:

Tulatromicina: se reduce su potencia antibacteriana al disminuir el pH en un aparato respiratorio ya infectado. Por tal razón se le usa más como preventivo.

Florfenicol LA y LA mejorado: en el primer caso a menudo se requiere una segunda y hasta tercera aplicación, lo que genera un manejo muy difícil en grandes
5 engordas; mientras que en el segundo caso, aún cuando las concentraciones plasmáticas duran hasta 120 horas, la viscosidad de la formulación la hacen de difícil aplicación, sobre todo si se habla de aplicaciones en explotaciones de gran tamaño.

Enrofloxacin: existen muchos medicamentos genéricos de muy baja calidad y que no son bioequivalentes. Este fármaco requiere a menudo más de una dosis y no se
10 usa como preventivo, solo como tratamiento.

Ceftiofur cristal ácido: requiere técnica especial de inyección en la oreja y sólo sirve para tratamiento.

Oxitetraciclina LA: ya existe mucha resistencia y como preventivo requiere de varias dosis.

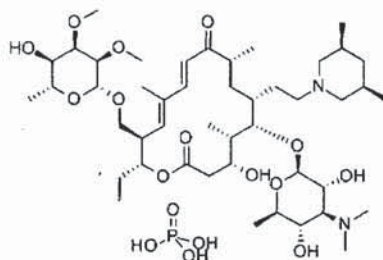
15 **BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION**

Se ha encontrado sorprendentemente que ampliando el tiempo de duración del efecto terapéutico de la tilmicosina se mejora enormemente la eficiencia en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades infecciosas de tipo bacteriano del aparato respiratorio, preferiblemente en el tratamiento del CRB y adicionalmente se logra un efecto terapéutico
20 y preventivo de infecciones intramamarias desde su aplicación parenteral, en el periodo de "las vacas secas" y por consecuencia en las primeras fases de la lactancia (que son las más susceptibles).

En razón de lo anterior, se desarrollo una nueva composición de tilmicosina formulada para acción o liberación prolongada mejorada, la cual va de 9 a 10 días de
25 duración en plasma con respecto a la tilmicosina de referencia que únicamente tiene una duración de 2 a 3 días, además de que dicha nueva formulación de tilmicosina no tiene efectos cardiotóxicos.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a dicha nueva composición de tilmicosina formulada para acción o liberación prolongada mejorada, la cual comprende: fosfato de tilmicosina en una concentración que va de 35 a 50% en peso de la composición total; un primer co-solvente en una concentración que va de 8 a 20% en volumen, en donde dicho primer co-solvente es propilenglicol; un segundo co-solvente en una concentración que va de 5 a 15% en volumen, en donde dicho segundo co-solvente es alcohol etílico; y, un emulsificante en una concentración de 1.5 a 15 % en peso del total de la composición, en donde dicho emulsificante es poloxamero.

La tilmicosina de acción prolongada mejorada que se describe de conformidad con una modalidad particularmente preferida de la presente invención tiene la siguiente fórmula:



Fórmula (I)

Por otro lado, la presente invención provee un método para obtener la tilmicosina de acción prolongada mejorada que se describe y reclama en la presente invención, en

20 donde dicho método comprende las etapas de:

(a) Transferir de 45 a 60 ml, preferiblemente 53 ml de agua destilada a un vaso de precipitados:

(b) Añadir al vaso de precipitados que contiene el agua destilada una cantidad de 8 a 20 ml de un primer co-solvente que es propilenglicol, y agitar hasta obtener una solución homogénea.

10

(c) Adicionar una cantidad de 5 a 15 ml de un segundo co-solvente que es alcohol etílico, y tapar el vaso con papel parafilm y mezclar hasta obtener una solución homogénea.

(d) Incorporar una cantidad que va de 35 a 50g de fosfato de tilmicosina, haciéndolo lentamente a fin de evitar la formación de grumos, y agitar hasta obtener una solución homogénea.

(e) Agregar una de 1.5 a 15g de un emulsificante, en donde dicho emulsificante es poloxamero, haciendo la adición de una manera lenta para lograr que se vaya homogenizando la solución.

10 (f) Refrigerar la solución anterior a una temperatura de 2 a 8°C por espacio de 1 hora. Sacar de refrigeración y agitar por 5 minutos.

(g) Refrigerar nuevamente por 24 horas agitando hasta obtener la completa disolución del poloxamero, obteniéndose el producto final.

15

OBJETOS DE LA INVENCION

Teniendo en cuenta los defectos de la técnica anterior, es un objeto de la presente invención el proveer una nueva tilmicosina formulada para acción o liberación prolongada mejorada.

Es otro objeto más de la presente invención proveer una nueva formulación de 20 tilmicosina de acción prolongada mejorada, cuya duración es de 9 a 10 días en plasma y al menos 20 días a nivel tisular tanto en el aparato respiratorio como en la glándula mamaria.

Un objeto adicional de la presente invención es proveer una nueva formulación de tilmicosina de acción prolongada mejorada que sea útil en el tratamiento y profilaxis de 25 enfermedades infecciosas respiratorias de tipo bacteriano, preferiblemente en el tratamiento del Complejo Respiratorio Bovino (CRB) y en la profilaxis y tratamiento de vacas productoras de leche en el periodo de "las vacas secas".

Sigue siendo un objeto más de la presente invención proveer una composición farmacéutica a base de tilmicosina de acción prolongada mejorada para fabricar un medicamento utilizado en medicina veterinaria contra las infecciones respiratorias de tipo bacteriano, así como en la profilaxis y tratamiento de la glándula mamaria en vacas
5 productoras de leche en el denominado periodo de las "vacas secas"

Es aún más otro objeto de la presente invención proveer una composición farmacéutica a base de tilmicosina de acción prolongada mejorada que no tenga efectos cardiotóxicos.

Es todavía más un objeto de la presente invención proveer un método para la
10 obtención de tilmicosina de acción prolongada mejorada.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Los aspectos novedosos que se consideran característicos de la presente invención, se establecerán con particularidad en las reivindicaciones anexas. Sin
15 embargo, la invención misma, tanto por su organización, así como por su método de operación, conjuntamente con otros objetos y ventajas de la misma, se comprenderán mejor en la siguiente descripción detallada de una modalidad particularmente preferida de la presente invención, cuando se lea en relación con los dibujos que se acompañan, en los cuales:

20 La figura 1 es un trazo electrocardiográfico basal y 2 horas después de la aplicación del preparado de tilmicosina de acción prolongada mejorada [(Til_{APM}(1))] a dosis de 24 mg/kg.

La figura 2 es un trazo electrocardiográfico basal y 2 horas después de la aplicación del preparado de tilmicosina de acción prolongada mejorada [(Til_{APM} (2))] a
25 dosis de 30 mg/kg.

La figura 3 muestra las medias de las concentraciones de urea, creatinina y albúmina en animales medicados con Til_{APM} (1) y Til_{APM} (2) antes de la administración de este preparado (valor basal al día cero) y 7, 14 y 21 días después.

La figura 4 muestra valores de CPK plasmática posteriores a la administración de Til_{APM} (1) y Til_{APM} (2), así como de tilmicosina de referencia [(Til_{REF} (Micotil®)) a dosis de 10 mg/kg.

La figura 5 es una gráfica en donde se muestra la regresión de la curva de recuperación utilizada para cuantificar la actividad/concentración de tilmicosina en suero ($r^2=0.98$).

La figura 6 es una gráfica en la que se muestra el promedio $\pm$ 1DE de las concentraciones de los preparados de fosfato de tilmicosina (tilmicosina de acción prolongada mejorada) y comparado con los datos logrados para tilmicosina de referencia (Micotil®).

La figura 7 es una gráfica en la que se muestran los perfiles cinéticos de dosis dobles de tilmicosina de referencia (Micotil®) a partir de una inyección de 10 mg/Kg.

La figura 8 es una gráfica en la que se muestra las concentraciones de tilmicosina en leche o fluido lácteo extraído durante la seca de vacas Holstein/Friesian, posterior a dos administraciones de tilmicosina de Til_{APM} (1) a dosis de 24 mg/kg el día cero y el día 20.

La figura 9 es una gráfica en la que se muestra el número de casos de mastitis por semana en el post-parto, en vacas tratadas al iniciar el secado con antibióticos intramamarios de diversa naturaleza y registrados para tal uso (tratamiento convencional) y vacas tratadas por vía parenteral con Til_{APM} (1) a dosis de 24 mg/kg al iniciar la seca y 20 días después, por vía subcutánea (SC).

La figura 10 es una gráfica en la que se muestran las tendencias del conteo de células somáticas en leche durante 8 semanas posteriores al parto, proveniente de vacas tratadas al iniciar el secado con antibióticos intramamarios de diversa naturaleza y

registrados para tal uso (tratamiento convencional) y vacas tratadas por vía parenteral con Til_{APM} (1) a dosis de 24 mg/kg al iniciar la seca y 20 días después, por vía subcutánea (SC).

La figura 11 muestra cromatogramas tipo de la curva de calibración obtenida de la
5 lectura del HPLC.

La figura 12 es una gráfica que muestra la curva de calibración de tilmicosina base obtenida de la lectura del HPLC.

La figura 13 muestra cromatogramas tipo obtenidas por medio del HPLC de muestras de hígado fortificadas con tilmicosina base a una concentración de 10 ng/ml.

10 La figura 14 muestra cromatogramas tipo obtenidas por medio del HPLC de muestras de riñón fortificadas con tilmicosina base a una concentración de 10 ng/ml.

La figura 15 muestra cromatogramas tipo obtenidas por medio del HPLC de muestras de músculo fortificadas con tilmicosina base a una concentración de 10 ng/ml.

La figura 16 muestra cromatogramas tipo obtenidas por medio del HPLC de
15 muestras de grasa fortificadas con tilmicosina base a una concentración de 10 ng/ml.

La figura 17 es una gráfica que muestra las concentraciones de tilmicosina base en los diferentes tejidos analizados.

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS MODALIDADES DE LA INVENCION

20 Se ha encontrado sorprendentemente que ampliando el tiempo de duración del efecto terapéutico de la tilmicosina se mejora enormemente la eficiencia en el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades infecciosas respiratorias de tipo bacteriano, preferiblemente en el tratamiento del CRB y en el periodo de "las vacas secas".

En razón de lo anterior, se desarrollo una nueva composición de tilmicosina
25 formulada para acción o liberación prolongada mejorada, la cual va de 9 a 10 días de duración en plasma con respecto a la tilmicosina de referencia que únicamente tiene una

duración de 2 a 3 días, además de que dicha nueva formulación de tilmicosina no tiene efectos cardiotóxicos.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a dicha nueva composición de tilmicosina formulada para acción o liberación prolongada mejorada, la cual comprende:

5 fosfato de tilmicosina en una concentración que va de 35 a 50% en peso, preferiblemente 42% en peso de la composición total; un primer co-solvente en una concentración que va de 8 a 20% en volumen, preferiblemente 10% en volumen, en donde dicho primer co-solvente se selecciona del grupo que comprende los co-solventes más comunes utilizados en la formulación de medicamentos tales como sorbitol, glicerina, derivados de

10 esteres glicéridos, alcohol etílico, alcohol isopropílico, propilenglicol, alcohol bencílico, polietilenglicol de bajo peso molecular (100, 200, 300, 400, 600 y 800) y derivados de polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerilformal, glucofurool, carbonato de etilo, lactato de etilo, dimetilacetamida o 2-metil pirrolidona, entre otros; utilizando preferiblemente propilenglicol; un segundo co-solvente en una concentración que va de 5 a 15% en

15 volumen, preferiblemente 10% en volumen, en donde dicho segundo co-solvente se selecciona del grupo que comprende los co-solventes más comunes utilizados en la formulación de medicamentos tales como sorbitol, glicerina, derivados de esteres glicéridos, alcohol etílico, alcohol isopropílico, propilenglicol, alcohol bencílico, polietilenglicol de bajo peso molecular (100, 200, 300, 400, 600 y 800) y derivados de

20 polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerilformal, glucofurool, carbonato de etilo, lactato de etilo, dimetilacetamida o 2-metil pirrolidona, entre otros; utilizando alcohol etílico; y, un emulsificante en una concentración de 1.5 a 15 % en peso, preferiblemente 3% en peso del total de la composición, en donde dicho emulsificante puede ser cualquier surfactante con actividad emulsificante capaz de estabilizar el sistema, utilizándose preferiblemente

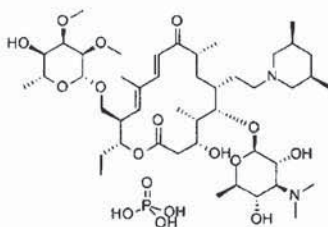
25 poloxamero como emulsificante.

Para los efectos de la presente descripción deberá entenderse por liberación controlada a cualquier técnica de formulación en donde a liberación del principio activo o

fármaco a partir de la forma de dosis se modifica para ocurrir a una velocidad más lenta que aquella de un producto de liberación inmediata y que luego la concentración de dicho fármaco se mantenga por un tiempo prolongado.

Asimismo, por liberación retardada deberá entenderse cualquier técnica de
5 formulación en donde la liberación de la sustancia activa o fármaco a partir de la forma de dosis se modifica para ocurrir a un tiempo posterior que aquella de un producto convencional de liberación inmediata. La liberación subsecuente de la sustancia activa a partir de una formulación de liberación retardada puede controlarse también como se definió anteriormente.

10 La tilmicosina de acción prolongada mejorada que se describe de conformidad con una modalidad particularmente preferida de la presente invención tiene la siguiente fórmula:



15

Fórmula (I)

Por otro lado, la presente invención provee un método para obtener la tilmicosina de acción prolongada mejorada que se describe y reclama en la presente invención, en
20 donde dicho método comprende las etapas de:

(a) Transferir de 45 a 60ml, preferiblemente 53ml, de agua destilada a un vaso de precipitados:

(b) Añadir al vaso de precipitados que contiene el agua destilada una cantidad de 8 a 20ml, preferiblemente 10ml, de un primer co-solvente que se selecciona del grupo
25 que comprende co-solventes más comunes utilizados en la formulación de medicamentos tales como sorbitol, glicerina, derivados de esteres glicéridos, alcohol etílico, alcohol isopropílico, propilenglicol, alcohol bencílico, polietilenglicol de bajo peso molecular (100,

200, 300, 400, 600 y 800) y derivados de polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerilformal, glucofurool, carbonato de etilo, lactato de etilo, dimetilacetamida o 2-metil pirrolidona, entre otros; utilizando preferiblemente propilenglicol y agitar hasta obtener una solución homogénea.

5 (c) Adicionar una cantidad de 5 a 15ml, preferiblemente 10ml, de un segundo co-solvente que se selecciona del grupo que comprende co-solventes más comunes utilizados en la formulación de medicamentos tales como sorbitol, glicerina, derivados de esteres glicéridos, alcohol etílico, alcohol isopropílico, propilenglicol, alcohol bencílico, polietilenglicol de bajo peso molecular (100, 200, 300, 400, 600 y 800) y derivados de
10 polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerilformal, glucofurool, carbonato de etilo, lactato de etilo, dimetilacetamida o 2-metil pirrolidona, entre otros; utilizando preferiblemente alcohol etílico. Tapar el vaso con papel parafilm y mezclar hasta obtener una solución homogénea.

(d) Incorporar una cantidad que va de 35 a 50g, preferiblemente 42g, de fosfato de
15 tilmicosina, haciéndolo lentamente a fin de evitar la formación de grumos, y agitar hasta obtener una solución homogénea.

(e) Agregar una cantidad de 1.5 a 15g, preferiblemente 3g, de un emulsificante, en donde dicho emulsificante puede ser cualquier surfactante con actividad emulsificante capaz de estabilizar el sistema, utilizándose preferiblemente poloxamero como
20 emulsificante, haciendo la adición de una manera lenta para lograr que se vaya homogenizando la solución.

(f) Refrigerar la solución anterior a una temperatura de 2 a 8°C por espacio de 1 hora. Sacar de refrigeración y agitar por 5 minutos.

(g) Refrigerar nuevamente por 24 horas agitando hasta obtener la completa
25 disolución del poloxamero, obteniéndose el producto final.

Un aspecto peculiar de la presente invención es proveer una composición farmacéutica a base de tilmicosina de acción prolongada mejorada utilizada en medicina

veterinaria. Asimismo, se provee el uso de dicha composición farmacéutica para fabricar un medicamento útil en el tratamiento de enfermedades infecciosas respiratorias de tipo bacteriano tales como el Complejo Respiratorio Bovino (CRB) y el periodo de "las vacas secas", entre muchas otras.

5 La presente invención será mejor entendida a partir de los siguientes ejemplos, los cuales se presentan únicamente con fines ilustrativos para permitir la comprensión cabal de las modalidades de la presente invención, sin que ello implique que no existen otras modalidades no ilustradas que puedan llevarse a la práctica con base en la descripción detallada arriba realizada.

10 Cabe señalar que para una mejor descripción de los ejemplos, la tilmicosina de acción prolongada mejorada que se describe y reclama en la modalidad preferida de la presente invención se ha identificado como Til_{APM} y la tilmicosina de referencia como Til_{REF}.

Ejemplo 1

15 **PROTOCOLO DE LAS PRUEBAS DE SEGURIDAD PARA TILMICOSINA DE ACCION
PROLONGADA MEJORADA (TIL_{APM})**

Con la Til_{APM} se logran concentraciones plasmáticas por más tiempo, mejorando su relación de farmacocinética/farmacodinamia.

Se eligió la tilmicosina porque que es uno de los fármacos de primera elección
20 para el tratamiento del CRB. Tiene una distribución elevada, incluso penetra a nivel intracelular y presenta menos resistencia bacteriana, en comparación con macrólidos de 14 átomos. Tiene propiedades antiinflamatorias y de inmunomodulación. Es útil contra una amplia gama de patógenos como: (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Mycoplasma spp*)

25 Se busca una concentración óptima a lo largo de una sola dosis, o bien durante el intervalo de tratamiento, teniendo en cuenta que los macrólidos tienen excelente distribución a tejidos pulmonares y son fármacos considerados tiempo-dependientes

desde el punto de vista clínico. Con base en lo encontrado en la literatura se postulan como metas concentraciones plasmáticas que fluctúen entre 0.1 y 2 $\mu\text{g/ml}$. Es particularmente importante para la tilmicosina no sobrepasar concentraciones de 4 $\mu\text{g/ml}$ pues se sabe que la tilmicosina induce cardiotoxicidad con taquicardia. El reto de lograr
5 las concentraciones dichas se gana al evitar que se logren valores pico en el plasma (cardiotóxicas), en este caso aún aumentando la dosis a niveles potencialmente tóxicos de 24 - 30mg/kg. Estas dosis incluyen la indicada para el nuevo prototipo y un margen debido a mal cálculo del peso del bovino.

Con estos antecedentes se diseñó una formulación parenteral de liberación
10 sostenida mejorada de tilmicosina que debe estar acotada entre los límites dichos a fin de evitar sus efectos cardiotóxicos. Un preparado de acción o liberación prolongada mejorada tiene ventajas terapéuticas importantes ya que se reconoce que un medicamento tempo-dependiente, y en particular para el manejo de los bovinos productores de carne, representa ventajas obvias tales como disminución del estrés por
15 manejo en una segunda inyección, ahorros en personal, equipo, pero sobretudo se postula una mayor eficacia clínica.

Material y Métodos

Localización y animales: Esta fase se realizó en las instalaciones del CEIEPASP. Se utilizaron 21 becerros divididos aleatoriamente en 4 grupos de 8 bovinos
20 cada uno los grupos de referencia [Til_{REF} (Micotil®)] y los grupos tratados con la Til_{APM} . Los animales se mantuvieron sin tratamiento antibacteriano o de otra índole al menos 30 días previos. Los calendarios de desparasitación e inmunización se conservaron conforme a las prácticas de manejo de la granja. La dosificación se realizó como sigue:

Grupo Referente (grupo R): A cada bovino (8 en total) se le pesó y se dosificó
25 tilmicosina individualmente por vía subcutánea (SC) a razón de 10 mg/kg del preparado original (Til_{REF}) sin aplicar más de 10 ml por sitio de aplicación, repartiendo la dosis en el dorso y la tabla del cuello.

Grupo Referente sobredosificado (grupo Rsd): a cada bovino (8 en total) se le peso y se dosificó tilmicosina individualmente por vía SC a razón de 20 mg/kg del preparado original (Til_{REF}) sin aplicar más de 10 ml por sitio de aplicación, repartiendo la dosis en el dorso y la tabla del cuello.

5 **Grupo Til_{APM} (1):** a dosis de 24 mg/kg a cada bovino (8 en total). Se les peso y dosificó tilmicosina individualmente por vía SC a razón de 24 mg/kg del preparado Til_{REF} sin aplicar más de 10ml por sitio de aplicación, repartiendo la dosis en el dorso y la tabla del cuello.

10 **Grupo Til_{APM} (2):** a dosis de 30 mg/kg a cada bovino (8 en total). Se les peso y dosificó tilmicosina individualmente por vía SC a razón de 30 mg/kg del preparado Til_{REF} sin aplicar más de 10ml por sitio de aplicación, repartiendo la dosis en el dorso y la tabla del cuello.

Posteriormente, se realizaron seguimientos de la frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria y trazo electrocardiográfico por medio de un ECG Fukuda cardisuny 501B-
15 III®, colocando electrodos de aguja percutáneos humedecidos con etanol al 70%. Se tomaron registros electrocardiográficos en derivada II a los siguientes tiempos en 1, 4, 8 y 24 horas post administración de los fármacos, que es cuando llega a ocurrir el Cmax de tilmicosina.

Adicionalmente se tomaron muestras sanguíneas basales (hora cero) y a los días:
20 1, 3, 5, 7, 9 y 11 después de la dosificación de Til_{APM} (1) y Til_{APM} (2), así como del grupo referente (Grupo R), a fin de determinar los perfiles de CPK (CPK ATP-cisteína 334 nm, Wiener) en plasma como medida del daño muscular adyacente a la(s) inyecciones y posible cardiotoxicidad.

A los 7, 14 y 21 días se tomaron muestras sanguíneas para determinar las
25 variables relacionadas con el perfil renal (urea, creatinina y albúmina). Además, todos los animales fueron observados diariamente durante el periodo del estudio, para detectar algún signo que mostrara alguna reacción adversa o toxicosis, tales como anafilaxia,

lagrimeo, salivación, diarrea, hepatotoxicosis, nefrotoxicosis, hemoglobinuria, reacción inflamatoria en el sitio de administración y fotosensibilización.

Resultados: En los grupos R, Til_{APM} (1) y Til_{APM} (2) no se detectaron ni taquicardias ni inversiones de la onda T, cambios característicos de sobredosificación. En el grupo Rsd se detectó en todos los animales un aumento de la frecuencia cardíaca de una media de 36 ± 4.8 latidos por minuto a 48 ± 6.4 latidos por minuto. Sin embargo, este efecto solo duró 8 horas aproximadamente y no se observó en ningún animal posterior a este tiempo.

En las figuras 1 y 2 de los dibujos que se acompañan, se presentan trazos electrocardiográficos típicos de los grupos Til_{APM} (1) y (2), respectivamente.

En el cuadro 1 se presenta la respuesta clínica en términos de respiraciones y frecuencia cardíaca a la aplicación de Til_{APM} (2) a la dosis de 30 mg/kg subcutánea (SC). Como puede apreciarse, no se detectaron cambios sustanciales en las variables medidas.

Cuadro 1. Relación de frecuencias cardíacas con dos tipos de dosificación del preparado de Til_{REF} y del preparado de Til_{APM} inyectado vía subcutánea (SC) en bovinos.

GRUPO	Dosis de tilmicosina en mg/kg	Frecuencia cardíaca basal $X \pm DE$	Frecuencia cardíaca a post-inyección ($X \pm 1 DE$)				
			30 min	1 hr	2 hrs	4 hrs	12 hrs
Grupo Referente	10	41 ± 10	46 ± 6.8	47 ± 7.5	42 ± 8.5	40 ± 6.5	40 ± 8.5
Grupo Referente sobredosificado	20	42 ± 8.5	49 ± 8.9	49 ± 10.5	43 ± 9.5	41 ± 8.4	40 ± 6.4
Grupo Til _{APM} (1)	24	39 ± 9.8	46 ± 8.4	48 ± 9.5	44 ± 10.5	40 ± 5.8	40 ± 8.8
Grupo Til _{APM} (2)	30	40 ± 6.5	47 ± 8.8	49 ± 6.8	45 ± 8.5	40 ± 7.8	40 ± 9.8

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre valores basales y valores posteriores a la aplicación de las formulaciones de tilmicosina

Asimismo, en la figura 3 se presentan las medias de las concentraciones de urea, creatinina y albúmina en animales medicados con tilmicosina de acción prolongada mejorada a dosis de 24mg/kg [(Til_{APM} (1))] y tilmicosina de acción prolongada mejorada a

dosis de 30mg/kg [(Til_{APM} (2))] antes de la administración de este preparado (valor basal al día cero) y 7, 14 y 21 días después, aplicando no más de 10ml por sitio.

Los valores de CPK se elevaron momentáneamente durante el primer día, producto de la irritación moderada en el sitio de aplicación y de manera muy similar a lo
5 que se observa con casi cualquier medicamento.

En la figura 4 de los dibujos que se acompañan se presentan esta tendencia para los grupos Til_{APM} (1), Til_{APM} (2) y Til_{REF} a dosis de 10mg/kg, Es importante notar que en todos los casos se presentó una ligera inflamación en los sitios de administración en los tres grupos, pero en ningún caso esta perduró más de 72 horas. De hecho la mayoría
10 desapareció a las 48 horas, lo que concuerda con la caída a niveles normales en los valores de la CPK. Asimismo, es importante notar como en todos los casos hay una recuperación total en las concentraciones de estas enzimas.

Conclusiones:

- No hay reacciones adversas en el sitio de administración de la Til_{APM} (1) o
15 Til_{APM} (2) en volúmenes nunca mayores a 10 mL por sitio de aplicación.
- No se detectaron efectos adversos al examen clínico en ninguno de los bovinos incluidos en este ensayo en los 4 grupos.
- No se detectaron variaciones de importancia o significativas en la frecuencia cardíaca ni en el trazo electrocardiográfico sugerente de toxicidad cardíaca en los grupos
20 experimentales de Til_{APM} (1) y Til_{APM} (2).
- Se detectaron cambios en las concentraciones de CPK plasmática de no más de 7 días de duración en los grupos de Til_{APM} (1) y Til_{APM} (2), así como de Til_{REF} (Micotil®) a dosis de 10 mg/kg, compatibles con el proceso inflamatorio observado y típico de los macrólidos inyectados y sin relación con una posible toxicidad cardíaca, toda vez que no
25 se detectaron cambios ni en la frecuencia cardíaca, ni en el trazo electrocardiográfico.
- No se detectaron cambios significativos o de importancia en las variables que definen función renal: urea, creatinina y albúmina séricas.

Ejemplo 2**ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE LA TILMICOSINA DE ACCIÓN PROLONGADA
MEJORADA (TIL_{APM}) EN BOVINOS**

5 **Animales.-** Se utilizaron 45 becerros divididos aleatoriamente en 3 grupos de 7 bovinos cada uno. El grupo 1 fue tratado con Til_{APM}(A), el grupo tratado 2 Til_{APM}(B) (repetición de la prueba A) y el grupo 3 con tilmicosina de referencia Til_{REF} (Micotil®). Los animales se mantuvieron sin tratamiento antibacteriano o de otra índole al menos 30 días previos. Los calendarios de desparasitación e inmunización se conservaron conforme a
10 las prácticas de manejo de la granja.

La dosificación se realizó como sigue:

Grupo 3 de referencia: cada bovino se peso y se dosificó con tilmicosina individualmente por vía subcutánea (SC) a razón de 10 mg/kg del preparado original (Micotil de Elanco ®), sin aplicar más de 10ml por sitio de aplicación, repartiendo la dosis
15 en el dorso y la tabla del cuello.

Posterior a la administración se realizaron los sangrados a los siguientes tiempos: 15 y 30 minutos, 1, 1.5, 2, 2.5, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 120 horas, obteniéndose un mínimo de 10ml por tiempo de sangrado. Las muestras fueron colectadas por punción de la vena yugular con tubos *vacutainer*. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000
20 rpm durante 10 minutos, se separo el suero y las muestras se mantuvieron en congelación (- 4°C) hasta el momento de su análisis, el cual se realizo antes de 1 mes.

Se monitoreo la frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria y trazo electrocardiográfico por medio de un ECG Fukuda cardisuny 501B-III®, colocando electrodos de aguja percutáneos humedecidos con etanol al 70%. Se tomaron registros
25 electrocardiográficos en derivada II a los siguientes tiempos en 1, 4, 8 y 24 horas post administración del fármaco.

Grupo 1: cada bovino se peso y dosifico con Til_{APM}, a una dosis de 24 mg/kg (1 ml/15-20 kg de peso) y se obtuvieron muestras de sangre en los tiempos arriba

señalados en el grupo 3. Las muestras de sangre fueron colectadas y manejadas de la manera ya descrita, al igual que el monitoreo con ECG.

Grupo 2 (repetición): cada bovino se pesó y dosificó con Til_{APM}, a una dosis de 24 mg/kg (1 ml/15-20 kg de peso) y se obtuvieron muestras de sangre en los tiempos arriba
5 señalados. Las muestras de sangre fueron colectadas y manejadas de la manera ya descrita, al igual que el monitoreo con ECG.

Todos los animales fueron observados diariamente durante el periodo del estudio para detectar algún signo que mostrara alguna reacción adversa o toxicosis, tales como anafilaxia, lagrimeo, salivación, diarrea, hepatotoxicosis, nefrotoxicosis, hemoglobinuria,
10 reacción inflamatoria en el sitio de administración y fotosensibilización.

Las concentraciones de tilmicosina se determinaron mediante técnica analítica de difusión en placa (la cual se describe más adelante) con las concentraciones individuales se realizaron corridas farmacocinéticas utilizando al programa WinNonline (WinNonlin Version 3.2, Pharsight, Mountain View, CA, USA) y PkAnalyst (MicroMath, Salt Lake,
15 Utah, USA) y el modelo 3 para determinar su farmacocinética compartamental mediante la siguiente formula general:

$$\text{Concentración (Tiempo)} = \frac{\text{Dosis} \cdot K_{AB}}{\text{Volumen } K_{AB} - K_{elim}} e^{-K_{elim} \cdot \text{Tiempo}} - e^{-K_{AB} \cdot \text{Tiempo}}$$

20 $T_{1/2b}$; Vd_{AUC} ; C_{max} ; T_{max} . Los resultados se compararon entre grupos mediante ANOVA y se graficaron utilizando el programa Origin 8.0 para Windows.

Cada bovino se pesó y se dosificó individualmente por vía SC y posterior a la administración se realizaron los sangrados a los siguientes tiempos: 15 y 30 minutos, 1, 1.5, 2, 2.5, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144 y 192 horas, obteniéndose un mínimo
25 de 10 ml por tiempo de sangrado. Las muestras fueron colectadas por punción de la vena yugular con tubos *vacutainer*. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm

durante 10 minutos, se separo el suero y las muestras se mantuvieron en congelación (-4°C) hasta el momento de su análisis el cual se realizo antes de 1 semana.

Determinación de las concentraciones séricas de tilmicosina en ratas y bovinos: Se utilizo el método analítico implementado por Bennett *et al.* (1966) el método se describe.

El agar a utilizar fue Agar Soya Trypticaseina (Bioxon) preparado a razón de 40g/l, siguiendo las indicaciones que marca el producto.

Cultivo bacteriano: Se utilizo una cepa bacteriana ATCC (*American Type Culture Collection*) 25922 de *Staphylococcus spp.*

10 **Estándar bacteriano:** En un tubo de tapón de rosca se colocan 5 ml de agua destilada y una asada del cultivo bacteriano joven (resembrado 24 horas antes) de *Staphylococcus spp.* y por medio de los estándares de Mc Farland se realizaron los ajustes necesarios a la dilución para obtener una concentración al 0.5 de Mc Farland.

La turbidez al 0.5 de Mc Farland se obtuvo por medio de un espectrofotómetro a 15 una transmitancia del 60-70 %, la cual corresponde a una concentración bacteriana de 1×10^8 .

Preparación de las placas: En un refractario tipo Pirex® de 21 X 20 cm, estéril, se colocaron 300ml de agar y se dejo enfriar durante 10 minutos. Sobre el agar ya frío se depositaron 200µl de la suspensión bacteriana y por medio de un hisopo estéril se 20 distribuyo homogéneamente sobre todo el agar.

Preparación de las diluciones: Se pesaron 20 g de estándar de tilmicosina (98% de pureza), se colocaron en un matraz y se aforo a 100 ml con agua desionizada (para su disolución se agregaron 0.5ml de una solución de 0.1N de NaOH, previo a la adición del agua desionizada). Se marcaron 10 tubos de 5ml del 1 al 10 y uno de 15ml con el número 25 0, en el tubo numerado con el 0 se colocaron 9ml de agua desionizada, mientras que en los demás tubos se coloco 1ml en cada uno de ellos. Del matraz se tomó 1ml y se agrego en el tubo 0 y se homogenizo, y de éste último se tomó 1ml y se agrego al tubo 1 y se

25

homogenizo, de éste último se tomó 1 ml y se agrego al tubo 2 y se homogenizó, y así sucesivamente se continuó hasta completar los 10 tubos, teniendo finalmente las siguientes diluciones:

5

No.	Concentración (µg/ml)
Matraz	200
Tubo 0	20
Tubo 1	10
Tubo 2	5
Tubo 3	2.5
Tubo 4	1.25
Tubo 5	0.625
Tubo 6	0.3125
Tubo 7	0.15625
Tubo 8	0.078125
Tubo 9	0.0390625
Tubo 10	0.01953125

10

Lectura de las placas: Una vez preparada la placa y con ayuda de un sacabocados se realizaron a lo largo del refractario dos hileras de 10 pozos cada una. Colocando en cada pozo 100µl de cada una de las diluciones, realizándose por duplicado. Se realizaron 5 placas en el mismo día con la misma metodología con la finalidad de tener un total de 10 lecturas, se incubarán durante 24 horas a 37°C.

Transcurridas las 24 horas se realizaron las lecturas de milímetros de halo de inhibición por pozo y por placa.

Procesamiento de las lecturas de los halos de inhibición: Se obtuvieron medias y desviaciones estándar del diámetro de halo de inhibición de cada una de las diluciones. A partir de los cuales y con ayuda de los programas Origin 8.0 para Windows y Excel, se obtuvieron las gráficas de milímetros de halo de inhibición vs. concentración.

Procesamiento de los sueros: Se prepararon las placas con la misma concentración bacteriana y del mismo modo en que se prepararon las placas para obtener el estándar mediante las pruebas de Bennett *et al* (1966), se realizaron los pozos en la misma forma que los anteriores y en la misma placa se sembraron los mismos tiempos de muestreo de los 10 grupos, colocándose 100µl de suero, se incubaron durante 24 horas y se realizaron las lecturas de los milímetros de halos de

inhibición, esto se repitió para cada uno de los tiempos de muestreo de cada uno de los grupos.

Procesamiento de los resultados: De los resultados obtenidos por tiempo de sangrado y por grupo se extrapolaron en la gráfica de concentración v.s. halo de inhibición obteniéndose así los $\mu\text{g/ml}$ de cada una de las muestras de suero.

Resultados:

En la figura 5 de los dibujos que se acompañan se presenta la curva de recuperación de la fase analítica por medio microbiológico.

10

Promedio de las medias de las variables farmacocinéticas calculadas por la composición actividad antibacteriana/concentración plasmática de tilmicosina por medio del análisis no compartamental y compartamental, después de administrar 2 preparados a dosis de 24 mg/kg via subcutanea (tilmicosina de acción prolongada mejorada v.s. tilmicosina de referencia (Micotil®))

15

	Til_{REF} (Micotil®)	Til_{APM}	Til_{APM} (Repetición)
	modelo 3pk r=98	PKModel #13 r=0.98	PKModel #3 r=0.96
AUC _{0-∞} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	100.28	149.62	203.65
AUMC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{mL}$)	1682.22	7717.46	14928.32
MRT (h)	20.31	49.55	74.53
T _{1/2} β ($\mu\text{g/mL}$)	14.08	34.35	51.66
T _{1/2ab} (h)	1.11	6.8	7.01
K _{el} (h^{-1})	0.05	0.01	0.01
C _{max} ($\mu\text{g/mL}$)	4.08	3.14	2.68
T _{max} (h)	3.06	3.88	0.08

20

AUC_{0-∞} = Área bajo la curva de la integral trapezoidal de la concentración vs tiempo de cero a ∞ con extrapolación de la fase terminal; AUMC = Área bajo la curva al primer momento; MRT = Tiempo medio de retención; α = constante de distribución; β = tasa constante de eliminación; K_{el} = Constante de eliminación desde el compartimiento central; T_{1/2ab} = Vida media de absorción; T_{1/2} β = Vida media de eliminación; Vd_{AUC} = Volumen aparente de distribución del AUC; C_{max} = Concentración máxima plasmática; T_{max} = Tiempo para llegar a C_{max}.

25

En la figura 6 de los dibujos que se acompañan se muestra el promedio $\pm$ 1DE de las concentraciones de los preparados de fosfato de tilmicosina (Til_{APM}) y comparado con los datos logrados para tilmicosina de referencia (Til_{REF}).

En la figura 7 de los dibujos que se acompañan, con la misma metodología, se presentan los perfiles cinéticos de dosis dobles de Til_{REF} como sistema para probar que la Til_{APM} no sigue la cinética de primer orden de eliminación que muestra dicha Til_{REF} y que en realidad es un sistema que se describe mejor con una cinética de absorción de orden cero. Se puede notar además que el intervalo de permanece casi inalterado.

Por referencia a las figuras 5 a 7 anteriores queda claro que:

- 10 ■ Se elevan las concentraciones pero no se aumenta la estancia (comportamiento farmacocinético de 1^{er} orden);
- Se genera una C_{max} (concentración máxima) más elevada dado que no está diseñado el preparado para evitarlo y se acerca más al nivel crítico tóxico de tilmicosina en corazón.
- 15 ■ La Til_{APM} transporta las concentraciones pico a "estancia" logrando periodos útiles en sangre de hasta 9 días o más (nótese que la escala es logarítmica).
- Es importante notar que el pico logrado no es útil terapéuticamente pues la tilmicosina es un antibacteriano dependiente del tiempo

En resumen, las diferencias sustanciales que observamos entre la Til_{APM} y de la

20 Til_{REF} son:

Til_{REF}	Til_{APM}
• Dura 48-72 horas en el plasma a dosis de 10 mg/kg • Dura 72 horas en el plasma a dosis de 20 mg/kg • Brinda 6 – 10 veces más las concentraciones en tejido respiratorio durante 96-144 horas • Es inmunoestimulante por 96-144 horas • Modera la reacción inflamatoria por 96-144 horas	• Dura al menos 216 horas o más en el plasma a dosis de 24 mg/kg • Tiene un vehículo que evita toxicidad por la sobredosis debida a cálculo erróneo del peso del bovino • Brinda 6 – 10 veces más las concentraciones en tejido respiratorio durante 432 horas (18 días) • Es inmunoestimulante por 432 horas (18 días) • Modera la reacción inflamatoria por 432 horas (18 días)

Ejemplo 3

**ESTUDIO CLÍNICO COMPARATIVO DE LA EFICACIA CLÍNICA DE LA TILMICOSINA
DE REFERENCIA (TIL_{REF}) Y LA TILMICOSINA DE ACCION PROLONGADA
MEJORADA (TIL_{APM}) EN EL TRATAMIENTO DEL COMPLEJO RESPIRATORIO
BOVINO (CRB).**

Objetivo.- Este proyecto tiene como objetivo comparar la eficacia clínica de la Til_{REF} (Micotil®) vs. la Til_{APM} con base en la premisa que dado que el efecto de la tilmicosina es dependiente del tiempo, un preparado del mismo antibacteriano que dure
10 más de 7 días en concentraciones terapéuticas en plasma y quizá mucho más en pulmones (dada la cinética de la tilmicosina ya referida), puede brindar mejores resultados clínicos en bovinos de carne, en brotes clínicos de campo definidos como del CRB.

Hipótesis.- La administración intramuscular de Til_{APM} que se describe y reclama
15 en la presente invención, a razón de 1 ml/15–20 kg de peso (21–28 mg/kg) genera respuestas clínicas superiores en el tratamiento empírico de enfermedades del CRB, por comparación a lo logrado con Til_{REF} (Micotil®) a dosis de 10 mg/kg, aplicándolos ambos por vía subcutánea (SC) en la tabla del cuello en dos sitios, con un volumen no mayor a 7ml por sitio de aplicación y en un máximo de 1 a 2 ocasiones.

20 **Material y métodos.-** El porcentaje de mortalidad y morbilidad debido a enfermedades respiratorias fluctúa del 1.5 al 20% y de 15 a 45% respectivamente, por tanto el tamaño de muestra fue calculado de la siguiente manera:

$$n = z^2 * p * q / d^2$$

en donde:

25 z (nivel de confianza) = 1.96 al 95% y 2.576 al 99%

p = probabilidad de que ocurra el evento

q = 1- p , probabilidad de que no ocurra el evento

d = error estimado

Por lo tanto, para este trabajo tenemos lo siguiente:

$$n = (1.96)^2 * (0.45) * (1-0.45)^2 / (0.5)^2 = 82 \text{ bovinos}$$

Por lo tanto, en cada tratamiento se incluyeron al menos 41 animales (siendo 6
5 el mínimo recomendado en cada grupo experimental según la USDA).

Se utilizó un modelo de presentaciones de enfermedades del CRB, clínicas de
campo - espontáneas – multicéntricas. El área de influencia cubierto fue Estado de
México, Estado de Hidalgo y Estado de Querétaro. Se incluyeron en este estudio
becerros Holstein, Holstein-Cebuinos y Holstein-Suizo en establecimientos de producción
10 de leche y en ganado estabulado o semiestabulado.

Se utilizó el preparado de Til_{APM} administrándolo a razón de 1 ml/15 o 20 kg de
peso que equivalen a una dosis de 21 a 28 mg/kg y que según los estudios
farmacocinéticos logran una duración de concentraciones plasmáticas de 7 días al
menos, de manera tal que en caso de requerirse se tenía contemplada un intervalo de
15 dosificación de cada 7 días.

En el grupo testigo como estándar de oro se incluyeron animales tratados con
Til_{REF} (Micotil®) a la dosis recomendada de 10 mg/kg cada 3 días si se presentase la
necesidad. En ambos casos la administración se hizo de manera subcutánea en la tabla
del cuello en dos sitios, con un volumen no mayor a 7 ml por sitio de aplicación.

20 Los criterios de selección de severidad de la enfermedad respiratoria se
presentan en el cuadro 2 siguiente:

**Cuadro 2. Clasificación por signos clínicos y hallazgos a la necropsia de tres
grados de severidad del complejo respiratorio bovino.**

Signos clínicos y hallazgos laboratorio	COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO (CRB)		
	GRADO I	GRADO II	GRADO III
Taquipnea	Raro o moderada	Moderada a severa	Severa
Patrón dispnéico	Incremento en esfuerzo inspiratorio, con movimiento de tórax	Lo mismo más estiramiento de cuello, miembros extendidos y postración	Lo anterior más postración y cianosis

5

Tos	Al hacerlos correr a veces productiva	Espontáneo y esporádico y casi siempre productiva	Espontáneo y continuo, siempre productiva. Seguida de algunos colapsos mortales
Rechazo a realizar esfuerzo	Leve o ausente	Se deja atrapar casi sin esfuerzo	No opone ninguna resistencia
Fiebre	Moderada por debajo de 39°C	Por arriba de 39°C	Siempre elevada arriba de 40°C
Secreciones por ollares	Común serosa o purulenta	Muy común sero-purulenta	Siempre, francamente purulenta

La asignación de casos se hizo de manera aleatoria, respetando los bloques como se describió en el cuadro de grado de gravedad. El criterio de curación se basó en la ausencia de fiebre, medida a distancia mediante un termómetro infrarrojo (Infrared thermometer TKTL 10, Texas Instruments, Dallas Tx, USA), tomando los ollares como referencia óptica y cuando los signos característicos del grado de afectación habían remitido por lo menos en un 50% a juicio de tres clínicos que evaluaron los casos de manera independiente y ciega al tratamiento. Se continuó la medicación si los signos no remitían en promedio de las tres observaciones en un 50%.

Los resultados se expresan en términos de eficacias comparativas cuantificadas como número de inyecciones necesarias para curación, horas para que se detectara reducción de la temperatura nivel basal, número de días para considerarse curado cada caso y eficacia global en por ciento.

Resultados: En el cuadro 3 (Ver Hojas Anexas) se presentan los datos obtenidos en este ensayo multicéntrico para la eficacia comparativa del preparado de Til_{APM} y de la Til_{REF} (Micotil®), administrándolo a razón de 1 mL/15 – 20 Kg de peso en el primer caso (21 – 28 mg/kg cada 7 días) o 10 mg/kg de Til_{REF} cada 3 días en el tratamiento del CRB. Un análisis estadístico mediante Chi reveló que los tratamientos a base de Til_{APM} son estadísticamente superiores en las variables de: Número de tratamientos para curación; tiempo para descender la temperatura a nivel basal, y esto ocurrió en los tres grados de severidad I, II y III, de severidad de la enfermedad ($P <$

0.01). En ningún caso hubo una diferencia estadística significativa en el número de días para curación, pero evidentemente se requirió tan solo de una inyección en los casos tratados con Til_{APM}.

Conclusiones:

- 5 ▪ El preparado de Til_{APM} que se describe y reclama en la presente invención es estadísticamente más eficaz por comparación a la Til_{REF} ($P < 0.01$) para el tratamiento de infecciones del CRB y que incluyen bacterias como el *Actinobacillus spp.*, *Manhemia haemolytica*, la *Pasteurella multocida*, *E. coli* y *Haemophilus somnus*, asociadas comúnmente a *Mycoplasma spp.*
- 10 ▪ Es importante señalar que aún cuando los dos preparados son a base de tilmicosina y son activos vs. *Mycoplasma spp.*, el hecho de que el preparado de Til_{APM} de la presente invención logre concentraciones plasmáticas útiles durante 7 días y no afecte el corazón, añade congruencia a la relación PK/PD de este principio activo que busca un efecto de más días y un valor de AUC (Área Bajo la Curva) mucho mayor que el
15 referente. Asimismo, es posible que el efecto sobre *Mycoplasma spp.* del preparado de Til_{APM} sea más marcado tanto por la dosis total como por los días en los que el fármaco permanece en concentraciones útiles en plasma y seguramente en tejidos respiratorios.
 - No se detectaron diferencias entre grupos de la velocidad con la que se reestablece la temperatura basal de los bovinos afectados. Esto era de esperarse dado
20 que la temperatura llegó a nivel basal dentro del tiempo en el que la tilmicosina de referencia aún muestra concentraciones plasmáticas útiles y obviamente el preparado de “tilmicosina de acción prolongada mejorada” también logra concentraciones adecuadas dentro de las primeras 72 horas.
 - Es importante señalar que en la mayoría de los problemas de tipo respiratorio
25 viral bovino [virus sinsitial respiratorio (RSV, por sus siglas en inglés)], para influenza III (PI3), rinotraqueítis viral bovina (IBR, por sus siglas en inglés) y diarrea viral bovina (BVD, por sus siglas en inglés), se asocian las bacterias mencionadas y que es común el

tratamiento de sostén con antibacterianos. También se indica el uso para efectos preventivos como en el caso de la tulatromicina. Por ello, los estudios realizados apoyan el uso curativo y preventivo o metafiláctico de la "tilmicosina de acción prolongada mejorada" que se describe y reclama en la presente invención.

5

Ejemplo 4

USO DE LA TILMICOSINA DE ACCION PORLONGADA MEJORADA (Til_{APM})

EN EL TRATAMIENTO DE LAS VACAS SECAS

Antecedentes: Se postula en este ensayo el secado parenteral en función de que se ha demostrado que fármacos de especialidad como la tilmicosina difunden muy bien a
10 todo el tejido mamario desde el plasma cuando se ha inyectado una dosis de 10 mg/kg vía subcutánea (SC). De hecho se describe que con las concentraciones séricas de 48 hr. de tilmicosina que se logran con el preparado comercial de Til_{REF} (Micotil®), se logran 7 días de concentraciones terapéuticas de tilmicosina vs. *Staph. aureus*.

La Til_{APM} tiene una duración de concentraciones séricas terapéuticas de 10 días
15 aproximadamente, por lo tanto, las concentraciones en leche pueden ser útiles contra muchos microorganismos patógenos, incluyendo el más difícil: *Staphylococcus aureus*, por al menos 20 días. De tal suerte que sin tocar las tetas de las vacas se pueden generar concentraciones homogéneas en las cuatro glándulas o cuartos de un animal al inyectar una dosis de tilmicosina de acción prolongada mejorada a dosis de 24mg/kg
20 [Til_{APM} (1)] y tilmicosina de acción prolongada mejorada a dosis de 30mg/kg [Til_{APM} (2)] por 20 días y si se repite esta inyección a los 20 días se tendrá protección contra las infecciones en el periodo de seca virtualmente durante todos los 45 días. Las ventajas de estos serían:

- Tratamiento de los 4 cuartos con una sola inyección cada 20 días (una al
25 inicio del periodo de secas y otra a los 20 días).
- Las vacas que lleguen a secado con infecciones subclínicas y aún clínicas serían tratadas correctamente (periodo de tratamiento de 40 días) sin manipular los

pezones ni maltratar el meato ni conducto de la teta. No se rompería el tapón fibrinoso de la teta.

- Como se ha descrito que la mayoría de las mastitis clínicas durante la lactación se adquieren durante el periodo de secas, es congruente pensar que un buen secado se refleje en una menor tasa o incidencia de mastitis clínicas durante las primeras 8 semanas, cuando los animales son más susceptibles.

- Lo anterior se traduce en una mayor producción de leche durante el periodo de lactación (un caso de mastitis reduce el tejido mamario productor de leche hasta en un 50%).

- 10 **Hipótesis:** La administración de Til_{APM} (1) y Til_{APM} (2) al inicio del período de seca y 20 días después genera concentraciones, en la leche o fluido mamario (que se logre obtener vía pezón), suficientemente elevadas como para ser consideradas terapéuticas durante todo el periodo de secas (40 – 45 días).

Objetivos:

- 15 1. Determinar las concentraciones de tilmicosina en muestras de leche o fluido mamario de vacas tratadas con Til_{APM} (1) y Til_{APM} (2) vía SC, aplicándola al inicio de la lactación y a los 20 días.
2. Evaluar en varios hatos en los que se aplique el esquema ya comentado de Til_{APM} la tasa de mastitis en las primeras 8 semanas post-parto.
- 20 3. Evaluar en vacas con conteos de células somáticas (CCS) elevados al inicio de la lactación y/o que hayan resultado positivas a ***Staphylococcus aureus*** o ***Streptococcus sp.***, la respuesta en términos microbiológicos una semana después del parto.

- Material y métodos:** Se emplearon para este ensayo únicamente vacas
- 25 Holstein/Friesian provenientes de 5 establecimiento dedicados a la producción de leche y ubicados en Tlaxcala y Estado de México

Fase I. Determinación de concentraciones de tilmicosina en fluido mamarios durante las secas y actividad contra *Staphylococcus aureus*.

Se incluyeron en este estudio un total de 32 vacas a las cuales se les aplicó el procedimiento de secado de una dosis vía SC de Til_{APM} (1) y Til_{APM} (2) SC al inicio del periodo de secado y 20 días después. Estos animales tenían una producción promedio del ciclo anterior de 23.8 ± 5.6 L y todas estaban en la lista de posibles desechos por estar positivas antes de la seca a *Staphylococcus aureus* y dado su historial de múltiples reincidencias a mastitis a pesar de una gran variedad de tratamientos con todo tipo de antibacterianos intramamarios. Antes del secado todos los animales presentaron valores de la prueba de California 2 o 3 y valores de células somáticas > a 1000,000.

A las vacas se les permitió terminar su periodo de seca, pero los animales sólo fueron muestreados una vez mediante masaje suave inicial, la inyección de 0.5 UI/kg de peso de oxitocina vía intramamaria (IM) y ordeño de al menos 350ml, de los cuales se desecharon los primeros 100ml a fin de lograr una muestra de tejido glandular más representativo del tejido mamario profundo y no solo del residual de la cisterna.

Los muestreos se realizaron de manera tal que se cubrieran los 45 días de secado con tres animales por tiempo, así:

No. de vacas	Días de secado
4	3
4	7
4	14
4	20, antes de la segunda inyección
4	23
4	30
4	37
4	44

Adicionalmente, se tomaron muestras del calostro dentro de las 2 a 3 horas posteriores al parto y se realizaron pruebas de Delvotest® a fin de evaluar si había presencia de agente inhibitorios.

Para evaluar microbiológicamente a todas las vacas en esta parte del ensayo, se tomaron muestras de leche los días 7 14 y 21, y se realizaron análisis bacteriológicos con

énfasis en la detección de *Staphylococcus aureus*, realizando crecimientos en agar sal manitol (medio de Chapman) como forma de aislamiento de esta bacteria.

Determinación de tilmicosina en muestras de leche: Se realizó mediante cromatografía de alta resolución conforme al método descrito en la fase de residuos. El
5 procedimiento incluye extracción de las muestras de leche con acetonitrilo y limpieza con cartuchos Sep-Pack (Waters, USA).

Fase II. Determinación de la tasa de mastitis los 45 días posteriores al parto con secado parenteral a base de Til_{APM}

En esta parte del ensayo participaron 5 establos de los estados de Tlaxcala y
10 Estado de México con características similares de tecnificación: ordeño mecánico, despunte antes de ordeña y lavado y sellado posterior a ésta, dos ordeñas e instalaciones de la sala de ordeño limpias. Además, se realizaron valoraciones de prueba de California a todos los animales al menos dos veces por semana y se tuvieron conteos de células somáticas en tanque, diarios y en las vacas sospechosas cuando fue
15 requerido. En todos estos establos se secaron a las vacas por 45 días y se utilizó un solo tubo intramamario por cuarto. Se utilizaron en estos establecimientos beta-lactámicos, incluyendo cefapirina benzatínica, neomicina, etc. Se tuvieron aproximadamente 20 a 35 secados por mes. De tal suerte que se dividieron a los animales aleatoriamente en tratamiento convencional (con tubo intramamario) y tratamiento experimental con Til_{APM}
20 parenteral a la dosis señalada de 24 y 30 mg/kg al iniciar la seca y otra inyección 20 días después. Las características generales del tamaño de los hatos involucrados fueron:

Establo	No. de vacas en producción	No. de vacas que se secan por mes	No. de vacas tratadas con Til _{AMP} en este ensayo	No. de vacas tratadas convencionalmente
El Puente	1,500	30	30	45
Rancho Grande	750	22	18	26
25 El Sauzal	2,000	48	32	30
Sta Mónica	1200	28	35	23
La Curva	1650	35	22	18

Todos los animales incluidos en esta fase entraron al estudio clínicamente sanos, con un conteo de células somáticas inferior a 300,000 CS/mL como criterio de inclusión California negativos y sin datos bacteriológicos positivos.

Se evaluaron dos parámetros: la incidencia de mastitis clínica post-parto, hasta las 5 8 semanas (56 días posteriores), sin registrar severidad ni etiología. Además se hizo un conteo de células somáticas individuales de las vacas en estudio, mediante contador automático (DeLaval Cell counter DCC, USA).

Resultados:

Fase I.- En el cuadro 4 se presentan las concentraciones de tilmicosina 10 encontradas en las vacas tratadas con Til_{APM} (1) a razón de 24 mg/kg SC al inicio del periodo de seca y 20 días después.

Cuadro 4. Valores medios $\pm$ 1 DE de las concentraciones de tilmicosina en leche o fluido lácteo extraído durante la seca de vacas Holstein/Friesian, posterior a dos administraciones de Til_{APM} a dosis de 24 mg/kg el día cero y el día 20. Cada punto es la media $\pm$ 1 DE de 4 muestras.

15	Días de secado	Media de cuatro determinaciones	$\pm$ 1 DE
	3	12,2	3,5
	7	8,4	2,6
	14	3,8	2,2
	20	1,2	0,6
	23	13,5	3,9
	30	9,2	2,8
	37	4,1	1,2
	44	0,8	0,6

20 En la figura 8 de los dibujos que se acompañan se muestran las concentraciones de tilmicosina en leche o fluido lácteo extraído durante la seca de vacas Holstein/Friesian, posterior a dos administraciones de tilmicosina de Til_{APM} (1) a dosis de 24 mg/kg el día cero y el día 20. Cada punto es la media $\pm$ 1 DE de 4 muestras. El valor de la CMI para la mayoría de los *Staphylococcus aureus* es $< 1.0 \mu\text{g/mL}$.

25 Los análisis bacteriológicos para encontrar *Staphylococcus aureus* revelaron que solo en 5 muestras de las 32 evaluadas el día 7 resultaron positivas a este patógeno (84.37% libre de *Staph. aureus*). En el día 14, 6 vacas fueron positivas a *Staph. aureus*

(81.25.% libre de *Staph. aureus*). En el día 21 no se detectó variación con respecto al día 14. En contraste, no hubo curaciones en el grupo tratado de manera convencional y todas las vacas resultaron positivas a ***Staphylococcus aureus*** a la semana del parto.

Todos las muestras de las vacas tratadas con Til_{APM} resultaron negativas a la
5 prueba de Delvotest® posterior al parto y todas las pruebas realizadas a las muestras obtenidas durante la seca resultaron positivas.

Con los datos obtenidos y el número de glándulas tratadas y un grupo testigo considerado como un solo tratamiento (convencional) se tuvo una eficacia del producto de al menos 80% suponiendo una respuesta del grupo testigo de 0.01%; lo que da un
10 valor de $P = 0.001$ y una potencia de la prueba = 0.95 (GPower).

Fase II.- Los resultados de esta fase, que se desarrollo a lo largo de 14 meses se presentan de manera porcentual en tasa de mastitis acumulada y sumada de los 5 establecimientos tanto para las vacas tratadas con Til_{APM} (167 vacas) de la manera ya expuesta y las vacas tratadas de manera convencional (142 vacas), se presenta en la
15 figura 9 de los dibujos que se acompañan, en la que se muestra el número de casos de mastitis por semana en el post-parto, en vacas tratadas al iniciar el secado con antibióticos intramamarios de diversa naturaleza y registrados para tal uso (tratamiento convencional) y vacas tratadas por vía parenteral con Til_{APM} (1) a dosis de 24 mg/kg al iniciar la seca y 20 días después, por vía subcutánea (SC).

20 En la figura 10 de los dibujos que se acompañan se presentan las tendencias del conteo de células somáticas en leche en vacas tratadas al iniciar el secado con antibióticos intramamarios de diversa naturaleza y registrados para tal uso (tratamiento convencional) y vacas tratadas por vía parenteral con Til_{APM} (1) a dosis de 24 mg/kg al iniciar la seca y 20 días después, por vía subcutánea (SC).

25 **Conclusiones:** El tratamiento de vacas secas con un esquema de Til_{APM} (1) a dosis de 24 mg/kg vía subcutánea (SC) al inicio de este periodo y 20 días después, genera una curación superior al 80% en vacas con infección por ***Staphylococcus***

aureus. Este valor es superior a todos los encontrados en la literatura, mismos que fluctúan en la mayoría de los casos alrededor del 30% de curación.

Lo anterior se refleja claramente en una notable disminución en la tasa de mastitis post-parto, lo que concuerda perfectamente con la baja incidencia de células somáticas y evidentemente se sabe que el aumento del recuento celular está estrechamente relacionado con un mayor porcentaje de vacas con problemas de ubre (subclínico y clínico). La mastitis subclínica y obviamente la clínica afecta el tejido productor de leche y causa una disminución en la producción.

Ejemplo 5

10 ESTUDIO DE LA DEPLECIÓN DE RESIDUOS DE TILMICOSINA DEL PREPARADO TILMICOSINA DE ACCION PROLONGADA MEJORADA (TIL_{APM})

Centro de análisis de muestras:

Cromatografía: Laboratorio de Investigación 2317 del Departamento de Fisiología y Farmacología, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la
15 Universidad Nacional Autónoma de México.

Objetivo del estudio: Estudiar la depleción de los residuos y la tolerancia local del medicamento veterinario Til_{APM} en bovinos.

Directrices reglamentarias: Vich guidelines gl43, gl48

Identificación del producto de ensayo: Til_{APM} solución inyectable al 20%

20

Composición:

Til _{APM}	20 g
Excipiente c.b.p.	100 ml

25

Administración y posología: Administrada por vía subcutánea (SC) en la tabla del cuello sin sobrepasar el límite de 10ml por sitio a razón de 30 mg/kg del producto de Til_{APM} (2).

Diseño experimental:

- **Animales:** Se emplearon 11 becerros F1 Holstein/Cebú de un peso inicial promedio de 276.09 ± 37.15 kg provenientes del Rancho "El Clarín" en Martínez de la

Torre, Veracruz, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México y se confirmó la ausencia de cualquier otro tipo de medicación, mediante los registros del rancho y toma de muestras basales de sangre a los animales, se corroboró en registros, que los animales no recibieron ningún fármaco en los 45 días anteriores al inicio de este ensayo.

- **Criterios de inclusión y no inclusión:** Los animales contaban con un rango de pesos de 180 a 235 kg (el peso promedio de los animales fue de 276.09 ± 37.15 kg) y no recibieron ninguna medicación 45 días anteriores al inicio de este ensayo. Los becerros no presentaron ningún signo de enfermedad y fueron F1 Holstein/Cebú. No se incluyeron animales que presentaban alguna signología respiratoria o digestiva, así como tratados con algún antibacteriano o analgésico en un margen de 1 mes.

- **Criterios de exclusión:** Aquellos animales que no cumplieron con los criterios de inclusión, ya mencionados anteriormente. Si algún animal sale positivo en las muestras de sangre basal a tilmicosina base se excluirá de la prueba.

- **Identificación:** Los animales que se incluyeron en la prueba fueron identificados con aretes especiales para ganado con el número del animal. Cada animal se pesó y dosificó individualmente. En el cuadro 5 se presenta el peso y la dosificación individual en gramos de producto y volumen administrado.

Cuadro 5. Peso de los animales que se utilizaron y dosificaron individualmente con el producto veterinario Til_{APM}, solución inyectable al 40% y a una dosis de 30 mg/kg.

Animal	Peso (kg)	Dosis (g/animal)	Dosis (mL/animal)
1	258	6708	16.77
2	269	6994	17.485
3	258	6708	16.77
4	189	4914	12.285
5	325	8450	21.125
6	265	6890	17.225
7	301	7826	19.565
8	321	8346	20.865
9	295	7670	19.175
10	278	7228	18.07
11	278	7228	18.07

Se inyectaron 10ml máximo del producto por punto de inyección subcutáneo en la tabla del cuello y se marcó el punto en el que se aplicó el mayor volumen con el fin de obtener los tejidos que se utilizaron para el análisis de los residuos.

Aclimatación y estabulación: Se alojaron a los animales en su ambiente habitual
5 con comida y agua a placer.

Dieta y alojamiento:

- **Pienso:** Los animales de la prueba recibieron la dieta habitual que se acostumbra en la explotación y formulada de acuerdo con sus necesidades para el desarrollo y producción.

10 - **Agua:** Todos los animales recibieron agua a placer y apta para su consumo

- **Alojamiento:** Los animales se alojaron en corrales en condiciones semi-intensivas

Condiciones ambientales: Martínez de la Torre que se encuentra ubicado en la zona Norte de Veracruz, en las coordenadas 20° 04' de latitud norte y 97° 04' de longitud
15 oeste, a una altura de 151 metros sobre el nivel del mar. Su clima es cálido-húmedo-regular con una temperatura promedio de 23.7°C. Su precipitación pluvial media anual es de 1,293.6 milímetros.

Tratamiento: Se aplicó el producto veterinario Til_{APM} al 40%.

Administración del medicamento: Se administró la dosis calculada para cada
20 animal por la vía subcutánea. La dosis fue de 1 ml/15-20 kg peso/día (equivalente a 24 mg de Tilmicosina base /kg peso). Sin administrar más de 10ml por sitio de aplicación. Para la administración del medicamento se utilizó una jeringa graduada de no más de 10ml para mantener una dosificación lo más exacta posible y se utilizó aguja del # 18.

A la fracción final de producto Til_{APM} que no se ocupó se le dio un tratamiento como
25 residuo y se desechó de acuerdo al manejo de residuos peligrosos químicos existente en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México, conforme al marco regulatorio NOM-052-058 SEMARNAT-2005.

Sacrificio y toma de muestras:

- **Método de obtención y procesamiento de muestras:** Con los datos de la $T_{1/2\beta}$ (vida media de eliminación) obtenidos en la fase cinética de este producto se hizo una proyección a cero residuos en 10 becerros, y se presentaron 3 días de sacrificio diferentes y la toma de muestras: uno antes del tiempo de cero residuos y dos posteriores para demostrar la presencia y posterior ausencia de residuos de la siguiente manera;

Fórmula:

$$\log C = C(0) - kt^{24}$$

Donde C = concentración

C(0) = concentración en el tiempo cero
por extrapolación de la línea recta
de regresión

k = α , β o γ

t = tiempo

Obtención y conservación de las muestras: Tras la administración se identificó el lugar de la inyección de forma precisa, mediante rasurado (15cm alrededor del punto), lo que permitió la posterior valoración de la tolerancia local del preparado y la toma de muestras.

Justo después del tratamiento se observaron diariamente a los animales para detectar y registrar posibles reacciones adversas inmediatas y mediatas. Los animales fueron sacrificados en el rastro (3 o 4 por día). De todos los animales se obtuvieron muestras de 10 a 50g de los siguientes órganos: riñón, hígado, músculo (sitio de administración) y grasa peri-renal, se les etiquetó y se les conservó en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis (no más de 7 días de tomadas las muestras). Uno de los becerros se utilizó como control, al cual no se le aplicó el tratamiento. Los cadáveres de los animales sacrificados fueron incinerados.

Envío y transporte de muestras: Las muestras de riñón, hígado, músculo (punto de inyección) y grasa peri-renal se conservaron en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis.

Análisis de las muestras:

- **Recepción y conservación de las muestras:** Las muestras se recibieron en congelación por medio de nitrógeno líquido, fueron identificadas, se separó cada muestra en dos viales y se mantuvieron en congelación hasta su análisis por cromatografía, la cual no fue de más de 30 días posterior a la toma de muestra.

5 - **Análisis de residuos de Til_{APM} de Laboratorios Karizoo:** Para el análisis de residuos de la tilmicosina base se utilizó un método modificado basado en el método desarrollado por Stobba-Wiley *et al.* (2000), con el cual se logró un porcentaje de recuperación de 80 a 85 % y un coeficiente de reproducibilidad con una variación de 5%.

10 - **Preparación de las muestras:** Se pesaron 5 gramos de tejido en un tubo de polipropileno tipo Falcon y se le adicionaron 10ml de acetonitrilo, se mezcló durante 10 minutos a 100 rpm con un agitador rotativo. Se añadieron 10ml de isooctano y se mezcló durante 5 minutos a 30 rpm. (Evitar que se forme la emulsión). Se centrifugó durante 10 minutos a 4000 rpm. La fase superior (isooctano) fue removida y 8ml de la fase inferior se pipeteo y se diluyó con 50ml de agua desionizada.

15 Se colocaron los 50ml a un reservorio y se conectó a un cartucho SPE Bond Elut C18 (6ml), el cual fue activado con 1ml de dimetildiclorosilano seguido de 10ml de metanol y 10ml de agua desionizada. La muestra extraída se obtuvo mediante un flujo de 2 gotas. La elusión se colocó en un tubo de 10ml y se reconstituyó con 1ml de acetonitrilo. La muestra obtenida se preparó después de acuerdo a la técnica descrita en
20 la farmacocinética.

Las muestras de tejido blanco libres (1g para hígado, riñón, músculo y grasa) obtenidas del animal no tratado, se adicionaron con las soluciones estándar de tilmicosina base usando 10µl de cada solución para obtener concentraciones finales de 1, 5; 10; 20, 40, 80 ng de tilmicosina base /g de tejido y concentraciones finales de 1, 5;
25 10; 20; 40, 80 ng. Posteriormente a las muestras de hígado, riñón, músculo y grasa adicionado con las soluciones de tilmicosina base se les adicionó 0.5ml de agua desionizada y 2ml de acetonitrilo y se agitaron en un mezclador (Vortex) por 20 minutos,

luego se micronizaron en un baño de ultrasonido por 20 minutos para posteriormente centrifugar las muestras a 4000 rpm por 10 minutos.

Resultados: Todos los animales salieron negativos en las muestras basales de sangre, por lo que no se excluyó ningún animal del protocolo. En el cuadro 6, así como en las figuras 11 y 12 de los dibujos que se acompañan, se presentan los picos de retención de las áreas bajo la curva de las concentraciones del estándar de tilmicosina base por medio de HPLC. Mediante la extrapolación de la fase de eliminación del estudio cinético y con la fórmula detallada en el párrafo de sacrificio y toma de muestras, se establecieron los siguientes tiempos de sacrificio:

- Antes del día de "cero residuos" (10 días)
- El día de "cero residuos" (30 días)
- Posterior al día de cero residuos (35 días)

En los cuadros 7 a 10 se presentan los porcentajes de recuperación de la tilmicosina base en hígado, riñón, músculo, grasa respectivamente y sitio de administración.

En las figuras 13 a 16 de los dibujos que se acompañan se muestra un ejemplo del estándar de la tilmicosina base y de cada uno de los tejidos fortificados.

En los cuadros 11 a 14 se muestran las concentraciones obtenidas en hígado, riñón, músculo y grasa por animal por día de muestreo y en la figura 11 se presentan las concentraciones encontradas de tilmicosina base en todos los tejidos analizados. Mientras que en el cuadro 15 se muestran las concentraciones en el sitio de aplicación.

Cuadro 6. Área Bajo la curva (promedio) de la curva de calibración obtenida de la lectura del HPLC.		
Concentración ng/mL)	Área Bajo la Curva Promedio*	DE±
80	65922	245.4
40	37191	489.3
20	15692	6.2
10	7781	148.8
5	3848	49.2
1	1971	24.5
<i>*El análisis se realizó por triplicado</i>		

Cuadro 7. Porcentaje de recuperación de la tilmicosina base en hígado fortificado con diferentes concentraciones del fármaco.

Concentración ng/g) fortificada	Área Bajo la Curva Promedio del estándar	Área Bajo la Curva Promedio del hígado fortificado*	Porcentaje de recuperación
20	12692	10788	85
10	6281	5339	85
5	3048	2530	83
1	1571	1257	80
<i>*El análisis se realizó por triplicado</i>			

Cuadro 8. Porcentaje de recuperación de la tilmicosina base en riñón fortificado con diferentes concentraciones del fármaco.

Concentración ng/g) fortificada	Área Bajo la Curva Promedio del estándar	Área Bajo la Curva Promedio del hígado fortificado*	Porcentaje de recuperación
20	12492	10618	85
10	6292	5285	84
5	3128	2628	84
1	1651	1321	80
<i>*El análisis se realizó por triplicado</i>			

Cuadro 9. Porcentaje de recuperación de la tilmicosina base en músculo fortificado con diferentes concentraciones del fármaco.

Concentración ng/g) fortificada	Área Bajo la Curva Promedio del estándar	Área Bajo la Curva Promedio del hígado fortificado*	Porcentaje de recuperación
20	12221	10387.85	85
10	6156	5232.6	85
5	3101	2573.83	83
1	1555	1275.1	82
<i>*El análisis se realizó por triplicado</i>			

Cuadro 10. Porcentaje de recuperación de tilmicosina base en grasa fortificado con diferentes concentraciones del fármaco.

Concentración ng/g) fortificada	Área Bajo la Curva Promedio del estándar	Área Bajo la Curva Promedio del hígado fortificado*	Porcentaje de recuperación
20	12110	10051.3	83
10	6258	5194.14	83
5	3100	2542	82
1	1472	1177.6	80
<i>*El análisis se realizó por triplicado</i>			

Cuadro 15. Concentraciones tilmicosina base ($\eta\text{g/g}$) en el sitio de aplicación

Día	Animal 1	Animal 2	Animal 3	PROMEDIO	$\pm 1 \text{ DE}$
10	9.23	12.1	7.28	9.53	2.42
30	0.85	0.93	0.73	0.84	0.10
35	nd	nd	nd	nd	nd

Cuadro 11. Concentraciones de tilmicosina base ($\eta\text{g/g}$) en hígado

Día	Animal 1	Animal 2	Animal 3	PROMEDIO	$\pm 1 \text{ DE}$
10	7.21	8.54	8.02	7.92	0.67
30	0.91	0.72	0.54	0.72	0.19
35	nd	nd	nd	nd	Nd

Cuadro 12. Concentraciones de tilmicosina base ($\eta\text{g/g}$) en riñón

Día	Animal 1	Animal 2	Animal 3	PROMEDIO	$\pm 1 \text{ DE}$
10	8.12	9.23	8.57	8.64	0.56
30	0.21	0.23	0.34	0.26	0.07
35	nd	nd	nd	nd	Nd

Cuadro 13. Concentraciones de tilmicosina base ($\eta\text{g/g}$) en músculo

Día	Animal 1	Animal 2	Animal 3	PROMEDIO	$\pm 1 \text{ DE}$
10	6.23	3.42	7.21	5.62	1.96
30	0.22	0.28	0.21	0.23	0.03
35	nd	nd	nd	nd	Nd

Cuadro 14. Concentraciones tilmicosina base ($\eta\text{g/g}$) en grasa

Día	Animal 1	Animal 2	Animal 3	PROMEDIO	$\pm 1 \text{ DE}$
10	6.23	5.18	5.53	5.70	0.53
30	0.75	0.54	0.37	0.55	0.19
35	nd	nd	nd	nd	nd

Modificaciones del protocolo: No se dieron.

Conservación de las muestras y documentación: Las muestras se identificaron

y almacenaron en crioviales y en bolsas Ziploc® y se mantuvieron en congelación (-20°C) hasta el momento de su análisis. La destrucción final de las muestras se llevó a cabo mediante el tratamiento como residuos patológicos de acuerdo al manejo de residuos

establecido en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México, conforme al marco regulatorio NOM-052-058 SEMARNAT-2005, por lo que se incineraron.

Informe final (conclusions):

- 5 • Los valores de vida media de eliminación indican que el producto inyectable de tilmicosina base (solución inyectable 20%) alcanza concentraciones de cero teórico alrededor del día 30 de tal manera que los tiempos de análisis de depleción de residuos son:

- Antes del día de cero residuos (10 días)
- 10 - El día de presencia de residuos cero (30 días)
- Posterior al día de hipotético cero residuos (35 días)

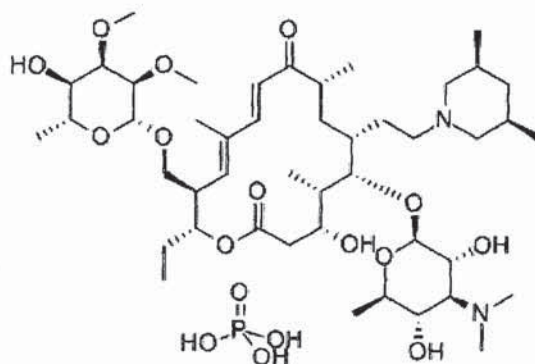
Se demostró que los animales no habían sido medicados previamente, obteniendo 0 residuos en el día previo a la administración del producto a evaluar y el día 30 se encontraron residuos en algunos tejidos blanco, para el día 35 no se encontraron
15 residuos en ninguno de los tejidos evaluados. Dado lo cual y considerando las sugerencias del anexo, se propone un tiempo de retiro de 35 a 40 días posteriores a la última aplicación.

Aún cuando en la anterior descripción se ha hecho referencia a ciertas modalidades de la tilmicosina de acción prolongada mejorada de la presente invención,
20 debe hacerse hincapié en que son posibles numerosas modificaciones a dichas modalidades, pero sin apartarse del verdadero alcance de la invención. Por lo tanto, la presente invención no debe ser restringida excepto por lo establecido en el estado de la técnica y por las reivindicaciones anexas.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

15 1.- Una nueva de formulación de tilmicosina que tiene la fórmula



caracterizada porque dicha tilmicosina ha sido formulada para acción o liberación prolongada mejorada.

25 2.- La formulación de tilmicosina de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque la liberación se prolonga desde 9 a 10 días de duración en plasma.

3.- La formulación de tilmicosina de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada además porque dicha formulación comprende: fosfato de tilmicosina en una
30 concentración que va de 35 a 50% en peso de la composición total; un primer co-solvente en una concentración que va de 8 a 20% en volumen, en donde dicho primer co-solvente se selecciona del grupo que comprende co-solventes más comunes utilizados en la formulación de medicamentos tales como sorbitol, glicerina, derivados de esteres glicéridos, alcohol etílico, alcohol isopropílico, propilenglicol, alcohol bencílico, polietilenglicol de bajo peso molecular (100, 200, 300, 400, 600 y 800) y derivados de polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerilformal, glucofurool, carbonato de etilo, lactato de etilo, dimetilacetamida o 2-metil pirrolidona, entre otros; un segundo co-solvente en una

concentración que va de 5 a 15% en volumen, en donde dicho segundo co-solvente se selecciona del grupo que comprende co-solventes más comunes utilizados en la formulación de medicamentos tales como sorbitol, glicerina, derivados de esteres glicéridos, alcohol etílico, alcohol isopropílico, propilenglicol, alcohol bencílico, polietilenglicol de bajo peso molecular (100, 200, 300, 400, 600 y 800) y derivados de polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerilformal, glucofurol, carbonato de etilo, lactato de etilo, dimetilacetamida o 2-metil pirrolidona, entre otros; y, un emulsificante en una concentración de 1.5 a 15 % en peso del total de la composición, en donde dicho emulsificante puede ser cualquier surfactante con actividad emulsificante capaz de estabilizar el sistema.

4.- La formulación de tilmicosina de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada además porque el fosfato de tilmicosina se encuentra en una concentración de 42% en peso de la composición total.

5.- La formulación de tilmicosina de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada además porque el primer co-solvente se encuentra en una concentración de 10% en volumen.

6.- La formulación de tilmicosina de conformidad con la reivindicación 5, caracterizada además porque el primer co-solvente es propilenglicol.

7.- La formulación de tilmicosina de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada además porque el segundo co-solvente se encuentra en una concentración de 10% en volumen.

8.- La formulación de tilmicosina de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada además porque el segundo co-solvente es alcohol etílico.

9.- La formulación de tilmicosina de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada además porque el emulsificante se encuentra en una concentración de 3% en peso del peso total de la composición.

10.- La formulación de tilmicosina de conformidad con la reivindicación 9, caracterizada además porque el emulsificante es poloxamero.

11.- Un método para obtener la formulación de tilmicosina de acción prolongada mejorada tal como la que se reclama en las reivindicaciones 1 a 10 precedentes, 5 caracterizada porque comprende las etapas de:

(a) Transferir de 45 a 60ml de agua destilada a un vaso de precipitados;

(b) Añadir al vaso de precipitados que contiene el agua destilada una cantidad de 8 a 20ml de un primer co-solvente que se selecciona del grupo que comprende co-solventes más comunes utilizados en la formulación de medicamentos tales como 10 sorbitol, glicerina, derivados de esteres glicéridos, alcohol etílico, alcohol isopropílico, propilenglicol, alcohol bencílico, polietilenglicol de bajo peso molecular (100, 200, 300, 400, 600 y 800) y derivados de polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerilformal, glucofurool, carbonato de etilo, lactato de etilo, dimetilacetamida o 2-metil pirrolidona, entre otros; y agitar hasta obtener una solución homogénea;

15 (c) Adicionar una cantidad de 5 a 15ml de un segundo co-solvente que se selecciona del grupo que comprende co-solventes más comunes utilizados en la formulación de medicamentos tales como sorbitol, glicerina, derivados de esteres glicéridos, alcohol etílico, alcohol isopropílico, propilenglicol, alcohol bencílico, polietilenglicol de bajo peso molecular (100, 200, 300, 400, 600 y 800) y derivados de 20 polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerilformal, glucofurool, carbonato de etilo, lactato de etilo, dimetilacetamida o 2-metil pirrolidona, entre otros; y tapar el vaso con papel parafilm mezclando hasta obtener una solución homogénea;

(d) Incorporar una cantidad que va de 35 a 50g de fosfato de tilmicosina, haciéndolo lentamente a fin de evitar la formación de grumos, y agitar hasta obtener una 25 solución homogénea;

(e) Agregar una de 1.5 a 15g de un emulsificante, en donde dicho emulsificante puede ser cualquier surfactante con actividad emulsificante capaz de estabilizar el

sistema, haciendo la adición de una manera lenta para lograr que se vaya homogenizando la solución;

(f) Refrigerar la solución anterior a una temperatura de 2 a 8°C por espacio de 1 hora, sacar de refrigeración y agitar por 5 minutos;

5 (g) Refrigerar nuevamente por 24 horas agitando hasta obtener la completa disolución del poloxamero, obteniéndose el producto final.

11.- Un método para obtener la formulación de tilmicosina de acción prolongada mejorada de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado además porque la cantidad de agua destilada transferida es de 53ml.

10 12.- Un método para obtener la formulación de tilmicosina de acción prolongada mejorada de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado además porque el primer co-solvente se añade en un volumen de 10ml.

13.- Un método para obtener la formulación de tilmicosina de acción prolongada mejorada de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado además porque el
15 primer co-solvente es propilenglicol.

14.- Un método para obtener la formulación de tilmicosina de acción prolongada mejorada de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado además porque el segundo co-solvente se añade en un volumen de 10ml.

15.- Un método para obtener la formulación de tilmicosina de acción prolongada
20 mejorada de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque el segundo co-solvente es alcohol etílico.

16.- Un método para obtener la formulación de tilmicosina de acción prolongada mejorada de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado además porque el fosfato de tilmicosina se agrega en una cantidad de 42g.

25 17.- Un método para obtener la formulación de tilmicosina de acción prolongada mejorada de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado además porque el emulsificante se agrega en una cantidad de 3g.

18.- Un método para obtener la formulación de tilmicosina de acción prolongada mejorada de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado además porque el emulsificante es poloxamero,

19.- Una composición farmacéutica a base de tilmicosina de acción prolongada
5 mejorada tal como la que se reclama en las reivindicaciones 1 a 10 para usarse en medicina veterinaria.

20.- El uso de la composición farmacéutica que se reclama en la reivindicación 19 para fabricar un medicamento útil en el tratamiento y profilaxis de enfermedades infecciosas respiratorias de tipo bacteriano, tales como el Complejo Respiratorio Bovino
10 (CRB) y el periodo de "las vacas secas", entre muchas otras.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/126233 A1

(43) Fecha de publicación internacional
27 de agosto de 2015 (27.08.2015) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 31/706 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/MX2015/000031

(22) Fecha de presentación internacional:
18 de febrero de 2015 (18.02.2015)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
MX/a/2014/001907
18 de febrero de 2014 (18.02.2014) MX

(71) Solicitante: **UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO** [MX/MX]; 9° Piso de la
Torre de Rectoría, Ciudad Universitaria S/N, C.P. 04510,
Distrito Federal (MX).

(72) Inventores: **SUMANO LOPEZ, Héctor Salvador**;
Cerrada de Hidalgo No. 129 - 2, Colonia San Pablo
Tepetiapa, C.P. 04620, Distrito Federal (MX).
GUTIÉRREZ OLVERA, Lilia; Cerrada de Hidalgo No.
129 - 2, Colonia San Pablo Tepetiapa, C.P. 04620, Distrito
Federal (MX).

(74) Mandatario: **FIGUEROA PÉREZ, Martha**; Edificio B,
3er Piso, Oficinas Administrativas Exteriores, Zona
Cultural de Ciudad Universitaria, CP. 04510, Distrito
Federal (MX).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible*): AE,
AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE,
KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS,
RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY,
TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible*):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,
SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: IMPROVED LONG-ACTING TILMICOSIN AND USE THEREOF IN THE TREATMENT OF BOVINE RESPIRATORY DISEASE COMPLEX (BRDC) AND IN THE DRY COW PERIOD

(54) Título : TILMICOSINA DE ACCIÓN PROLONGADA MEJORADA Y EL USO DE LA MISMA EN EL TRATAMIENTO DEL COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO (CRB) Y EN EL PERIODO DE LA VACA SECA

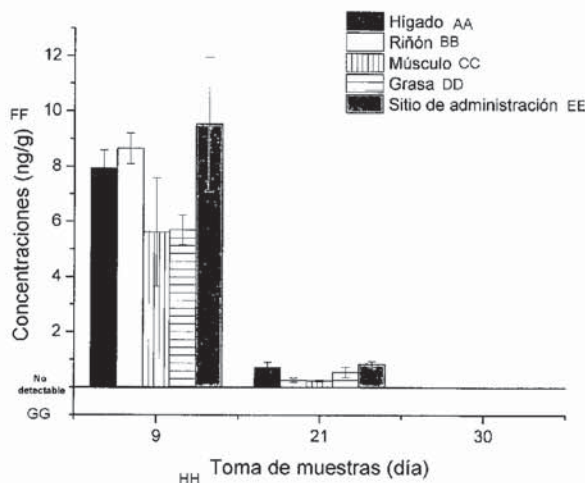


Figura 17

(57) Abstract: The invention relates to an improved long-acting or extended-release tilmicosin formulation comprising: tilmicosin phosphate in a concentration between 35 and 50% by weight of the total composition; a first cosolvent in a concentration between 8 and 20% by volume, said first cosolvent being propylene glycol; a second cosolvent in a concentration between 5 and 15% by volume, said second cosolvent being ethyl alcohol; and an emulsifier in a concentration between 1.5 and 15% by weight of the total composition, said emulsifier being poloxamer. The invention also relates to the method for producing said improved long-acting tilmicosin formulation.

(57) Resumen: Se describe una formulación de tilmicosina de acción o liberación prolongada mejorada que comprende: fosfato de tilmicosina

[Continúa en la página siguiente]

WO 2015/126233 A1

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

en una concentración que va de 35 a 50% en peso de la composición total; un primer co-solvente en una concentración que va de 8 a 20% en volumen, en donde dicho primer co-solvente es propilenglicol; un segundo co-solvente en una concentración que va de 5 a 15% en volumen, en donde dicho segundo co-solvente es alcohol etílico; y, un emulsificante en una concentración de 1.5 a 15 % en peso del total de la composición, en donde dicho emulsificante es polxamero. Asimismo, se describe el método de obtención de dicha formulación de tilmicósina de acción prolongada mejorada.

RESUMEN:

Se describe una formulación de tilmicosina de acción o liberación prolongada mejorada que comprende: fosfato de tilmicosina en una concentración que va de 35 a 50% en peso de la composición total; un primer co-solvente en una concentración que va de 8 a 20% en volumen, en donde dicho primer co-solvente es propilenglicol; un segundo co-solvente en una concentración que va de 5 a 15% en volumen, en donde dicho segundo co-solvente es alcohol etílico; y, un emulsificante en una concentración de 1.5 a 15 % en peso del total de la composición, en donde dicho emulsificante es polxamero. Asimismo, se describe el método de obtención de dicha formulación de tilmicosina de acción prolongada mejorada.

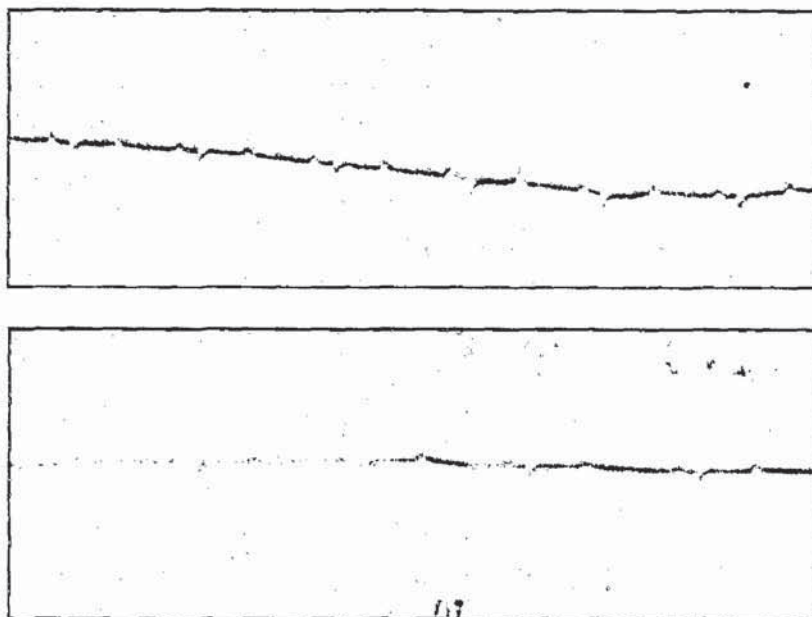


Figura 1

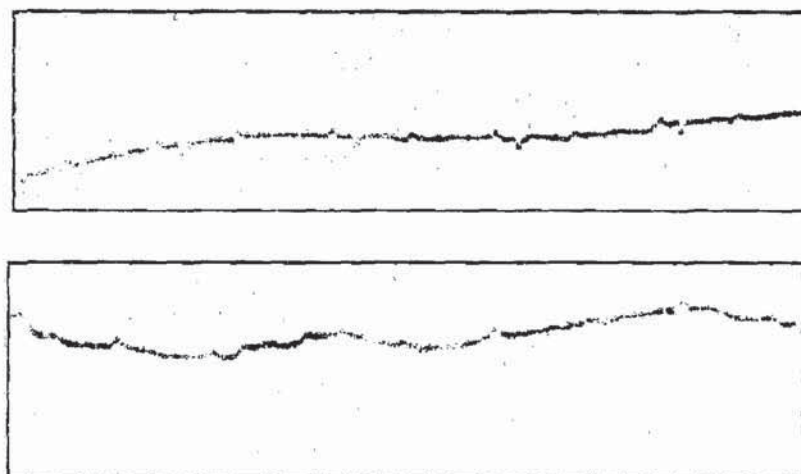


Figura 2

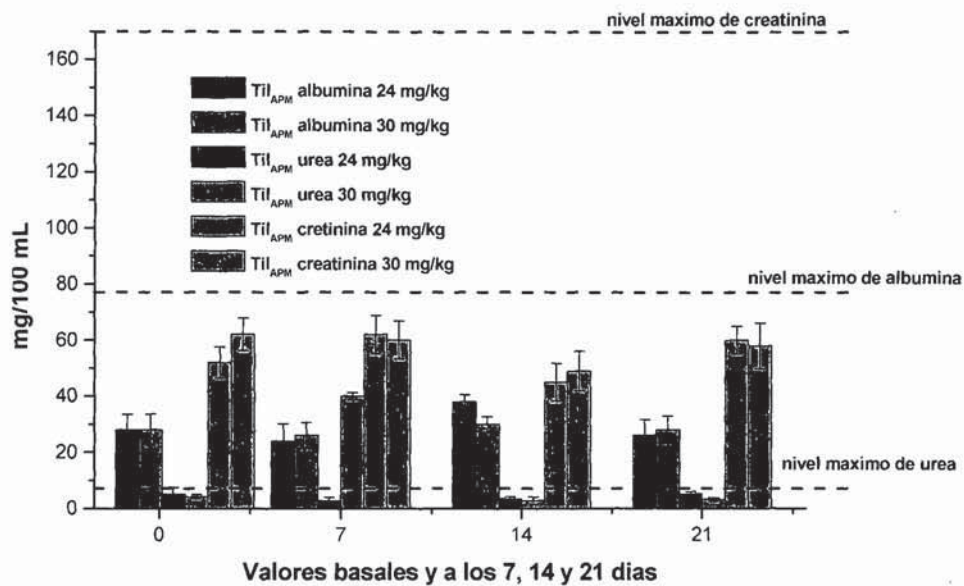


Figura 3

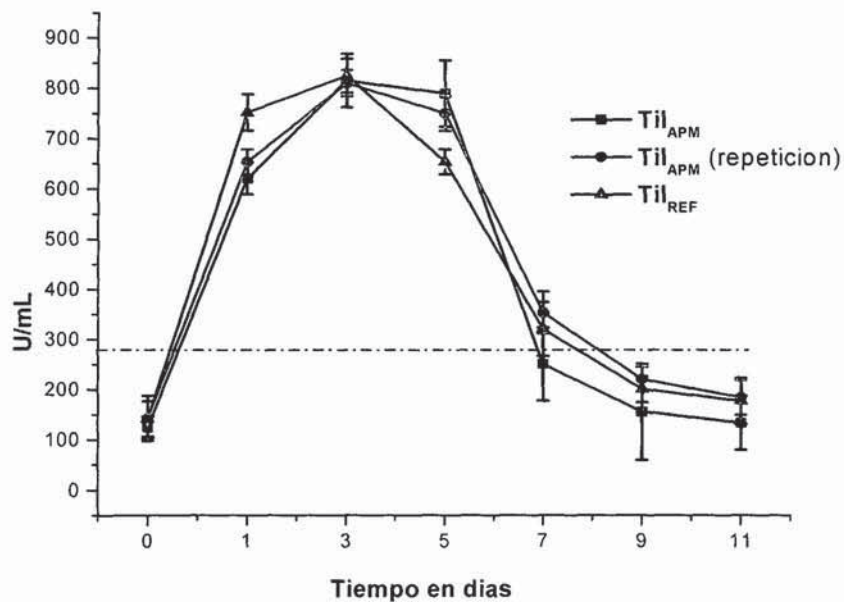
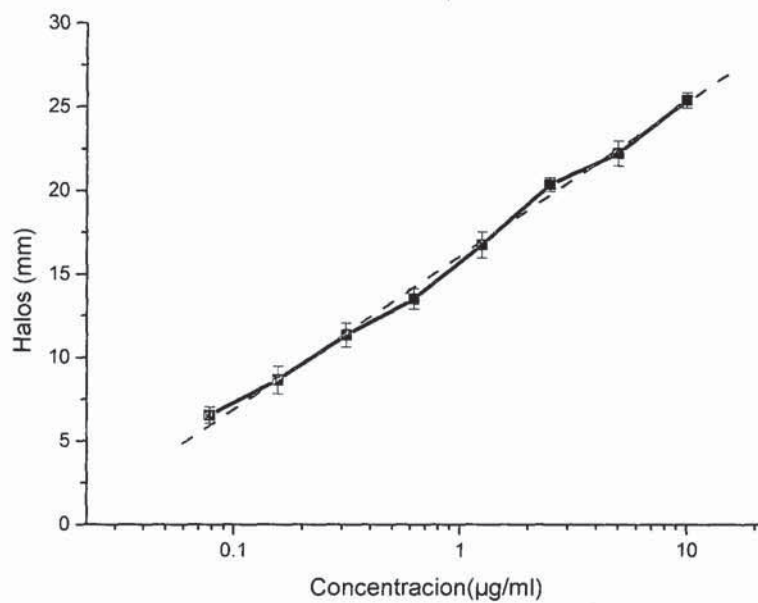
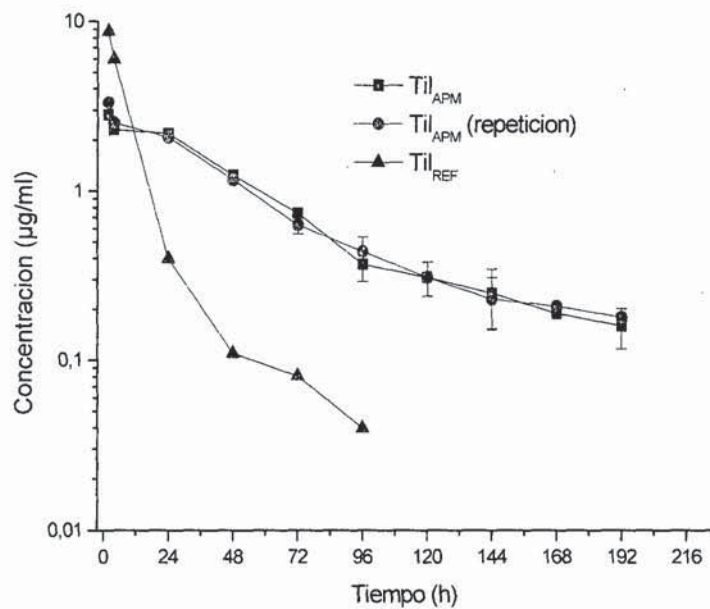


Figura 4

**Figura 5****Figura 6**

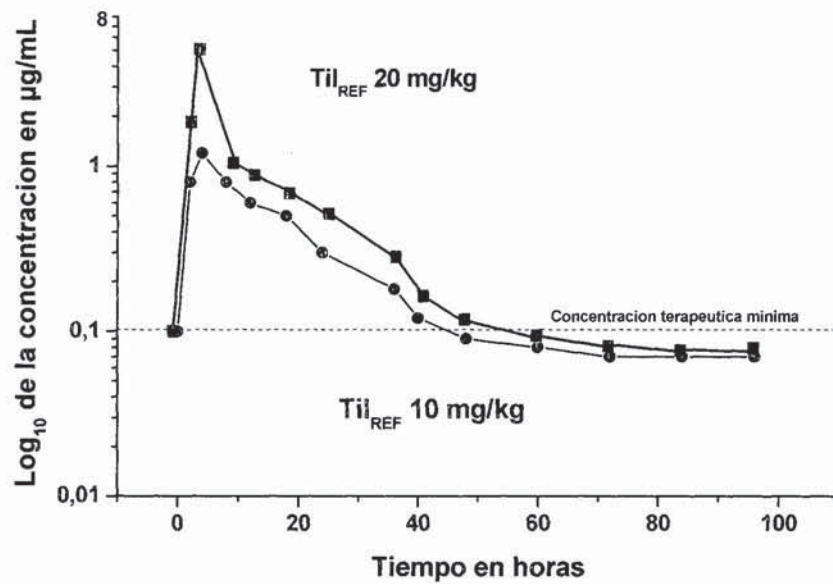


Figura 7

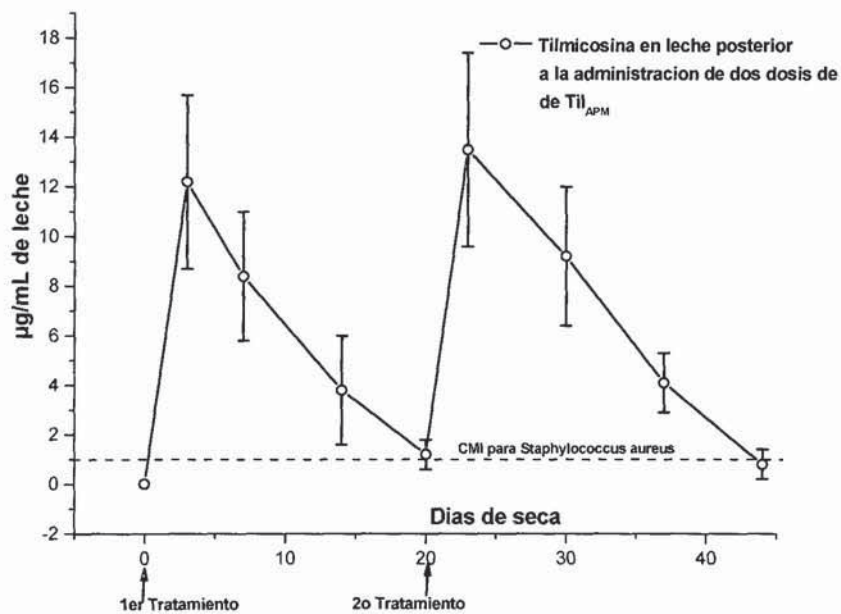


Figura 8

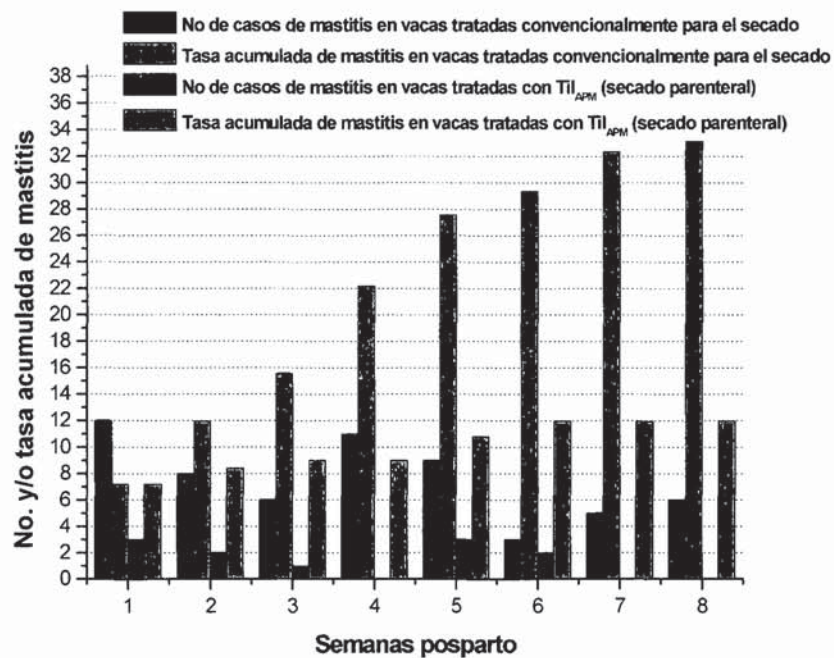


Figura 9

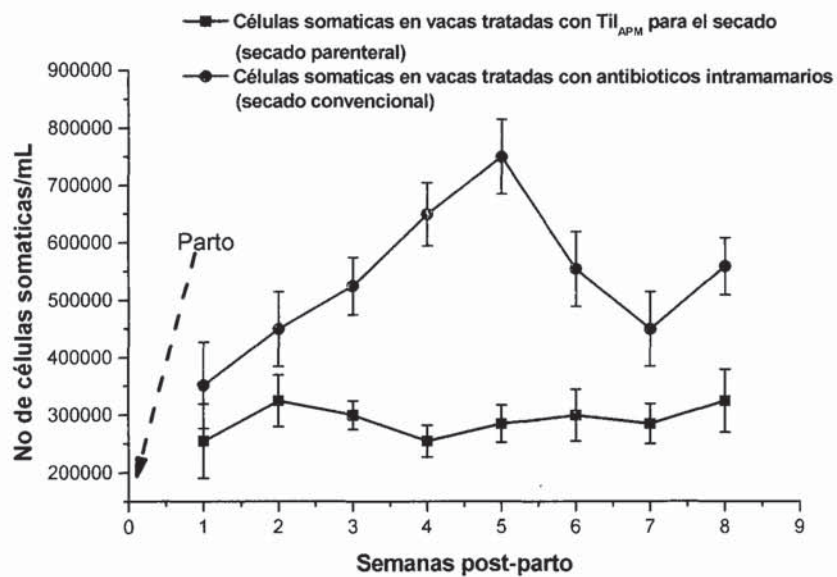


Figura 10

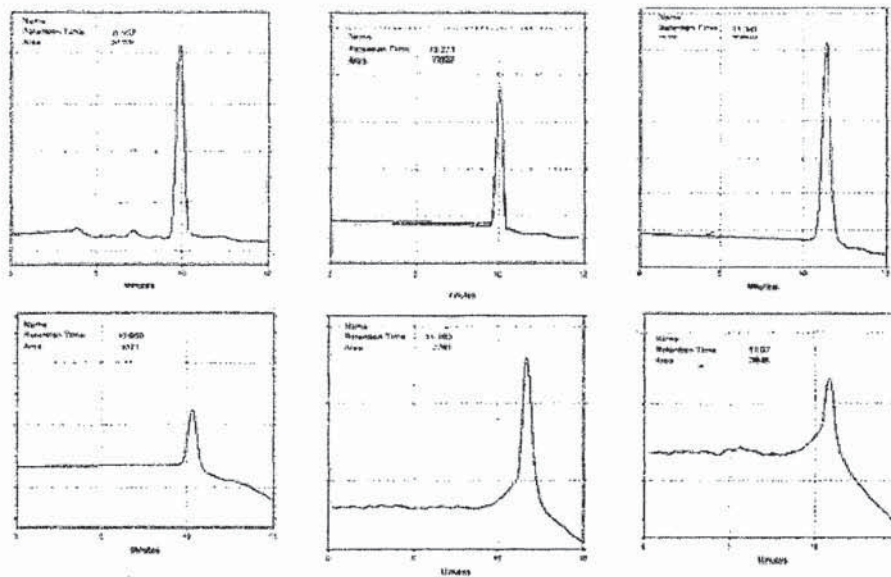


Figura 11

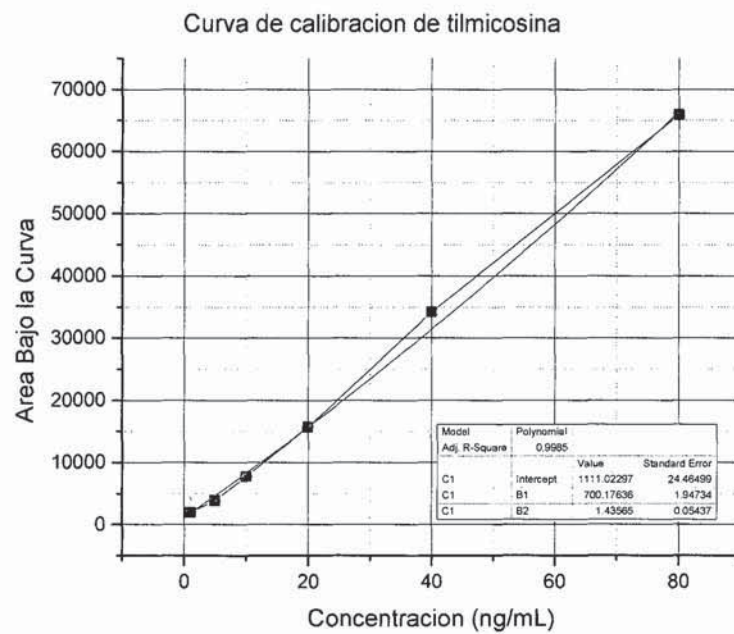
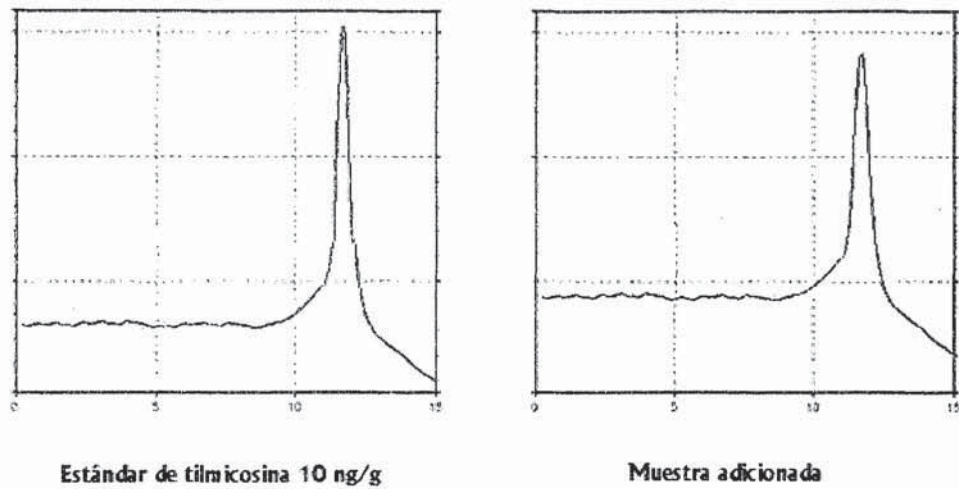
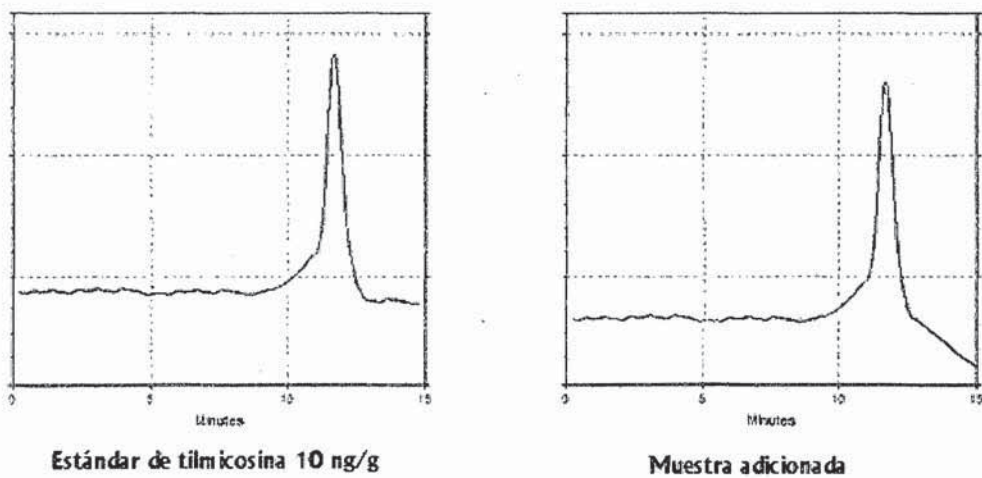
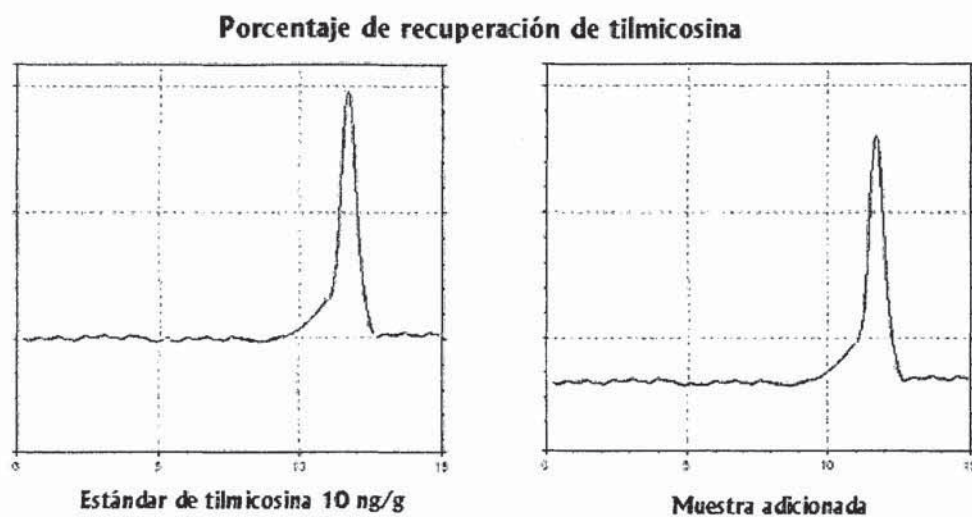
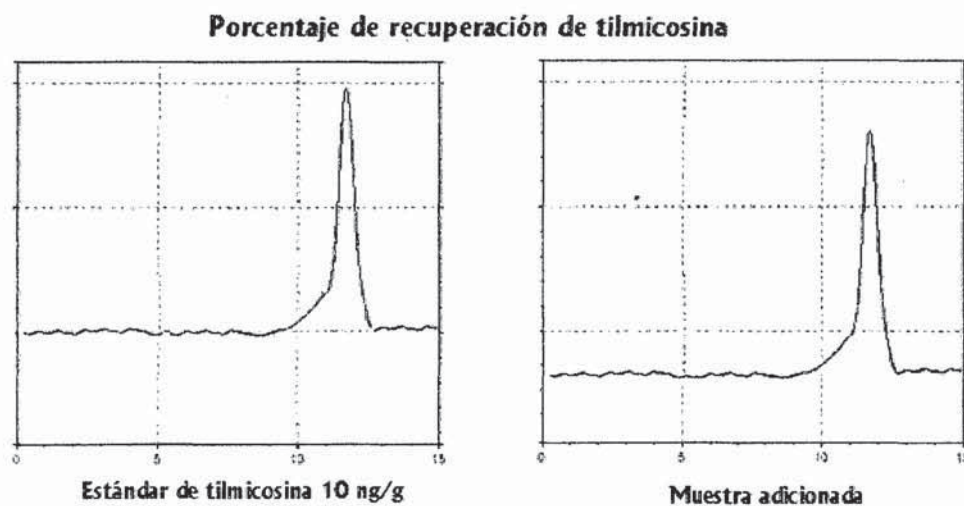
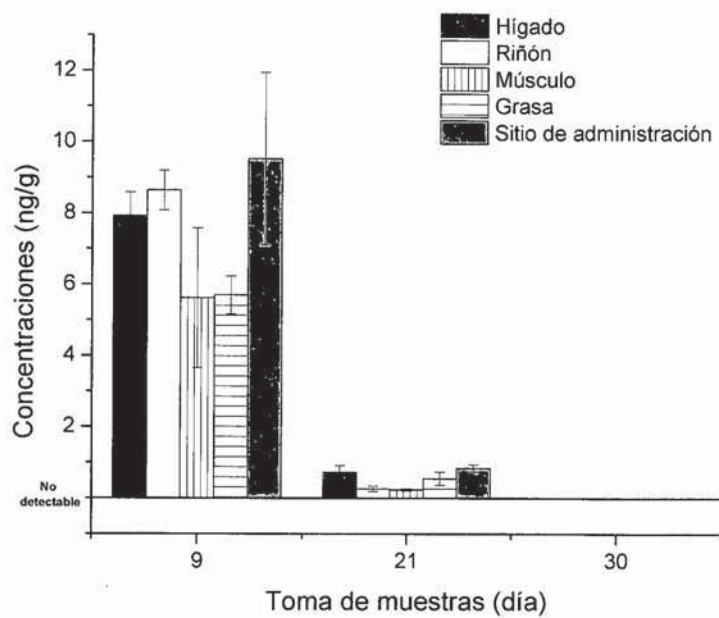


Figura 12

Porcentaje de recuperación de tilmicosina**Figura 13****Porcentaje de recuperación de tilmicosina****Figura 14**

**Figura 15****Figura 16**

9 / 11

**Figura 17**

Cuadro 3. Relación de la eficacia en el tratamiento del complejo respiratorio en becerros (curados/tratados y (%)), el número promedio de días para la curación en cada una de los establos, horas para control de fiebre y promedios generales.

Establo	Tratamiento	Eficacia en el tratamiento (%)			Media del número de días para curación.			Media del número de hrs. para reducción de temperatura a nivel basal		
		Gravedad I	Gravedad II	Gravedad III	Gravedad I	Gravedad II	Gravedad III	Gravedad I	Gravedad II	Gravedad III
1	Ti _{REF}	28/32 (87.5)	6/9 (66.66)	3/10 (30)	1.85	2.5	3	8.6 ± 12	24 ± 8	34 ± 12
	Ti _{APM}	29/29 (100)	8/8 (100)	7/7 (100)	1.65	2.5	3	7.2 ± 10	18.6 ± 5.6	28 ± 16
2	Ti _{REF}	10/12 (83.33)	7/10 (70)	2/6 (33.33)	1.75	2.75	3	9.8 ± 12	24 ± 7.8	34 ± 12
	Ti _{APM}	10/10 (100)	9/9 (100)	6/6 (100)	1.65	2.65	3	9.2 ± 10	16.6 ± 6.6	30 ± 11
3	Ti _{REF}	18/18 (100)	8/12 (66.66)	2/5 (40)	1.65	2.65	3	7.6 ± 8	28 ± 6	33 ± 8
	Ti _{APM}	19/19 (100)	12/12 (100)	6/6 (100)	1.85	2.75	3	7.8 ± 10	16.6 ± 4.6	25 ± 6
4	Ti _{REF}	22/25 (88)	9/14	3/7	1.65	2.65	3	9.6 ± 10	22 ± 4.4	34 ± 12

			(64.28)	(42.85)						
	Til ^{APM}	26/26 (100)	15/15 (100)	5/7 (100)	1.75	2.75	3	9.2 ± 12	21.6 ± 5.2	24 ± 16
5	Til ^{REF}	32/36 (88.88)	8/12 (66.66)	4/8 (50)	1.55	2.85	3	10.6 ± 12	24 ± 6.8	28 ± 7
	Til ^{APM}	33/33 (100)	11/11 (100)	7/8 (87.5)	1.65	2.85	3	11.2 ± 10	23.6 ± 4.8	22 ± 8
TOTALES	Eficacia	89.54	66.85	57.9	1.69 ± 0.11	2.68 ± 0.13	3	9.24 ± 1.16	20.4 ± 4.3	32.6 ± 2.6
	Til ^{REF}									
	Eficacia Til ^{APM}	100*	100*	97.50*	1.71 ± 0.08	2.7 ± 0.13	3	8.92 ± 1.5	19.4 ± 3.11	25.8 ± 3.19*

* Valor de eficacia estadísticamente diferente de su correspondiente a favor del preparado de Til^{AMP} (P< 0.05)

* Valor de eficacia estadísticamente diferente de su correspondiente a favor del preparado de Til_{AMP} (P<0.05)