



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 813**

51 Int. Cl.:
A61K 31/22 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06127207 .6**
96 Fecha de presentación : **03.07.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **1813272**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2007**

54 Título: **Uso veterinario de un derivado de pleuromutilina.**

30 Prioridad: **04.07.1996 GB 9614017**
04.07.1996 GB 9614016
04.07.1996 GB 9614015
04.07.1996 GB 9614014
04.07.1996 GB 9614013
04.07.1996 GB 9614012
04.07.1996 GB 9614019
04.07.1996 GB 9614018

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.06.2011

73 Titular/es: **SANDOZ AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es: **Burch, David George Sidney;**
Ripley, Paul, Howard y
Zeisl, Erich

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 360 813 T3

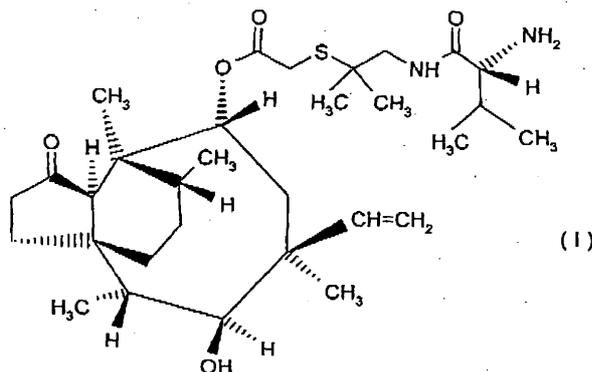
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso veterinario de un derivado de pleuromutilina

La invención se refiere a derivados de pleuromutilina de la fórmula I.

5 Trata del uso veterinario del compuesto de fórmula I



10 es decir, 14-O-[1-[(R)-2-amino-3-metilbutirilamino]-2-metilpropan-2-iltioacetil]mutilina en forma de base libre o de sal veterinariamente aceptable, en la terapia de una enfermedad veterinaria cuya expresión se potencia al incrementar la densidad de almacenamiento, llamado brevemente posteriormente en la presente memoria "el uso de la invención".

El compuesto de la fórmula I en forma de base libre o de sal veterinariamente aceptable (Econor®) se denomina posteriormente brevemente en la presente memoria "el agente de la invención". Preferiblemente, está en forma de sal, especialmente de hidrocloreto. En esa forma, se conoce bajo el nombre genérico hidrocloreto de valnemulina.

Ha de entenderse que el término "terapia" se aplica para el tratamiento profiláctico así como curativo.

15 El compuesto de fórmula I en forma de base libre o en forma de sal quimioterapéuticamente o veterinariamente aceptable se conoce de, p. ej., EP 153 277 y sus equivalentes, p. ej., USP 4 675 330, específicamente como el Ejemplo 12 de la misma.

Además, se conoce a partir de la misma

- una actividad inhibidora contra diversas bacterias in vitro, a concentraciones de alrededor de 0,008 a 25 µg/ml;
- 20 - una actividad inhibidora in vitro contra micoplasmas y clamidia, generalmente a concentraciones de alrededor de 0,008 a 0,5 µg/ml;
- una actividad inhibidora in vivo en ratones, usando diversas cepas bacterianas, y en gallinas, usando cepas de micoplasma, en una dosificación de alrededor de 12 a 50 mg/kg de peso corporal;
- una actividad antiparasitaria, en particular in vivo contra coccidios en aves de corral, en dosificaciones de 20-25 150 mg/kg de pienso; y
- actividad promotora del crecimiento en gallinas y cerdos in vivo, en una dosificación de 10-50 mg/kg de pienso,

30 haciendo así al compuesto útil como un antibiótico antibacterianamente activo generalmente y como un agente veterinario, en particular para el tratamiento quimioterapéutico de coccidiosis en aves de corral así como un promotor del crecimiento en gallinas y cerdos. McORIST, 1995, Antimicrobial susceptibility of ileal symbiont intracellularis isolated from pigs with proliferative enteropathy. J. Clin. Microbiol. 33:1314-1317 describe una prueba in vitro en la que se evaluó la susceptibilidad de Ileal Symbiont (= Lawsonia) intracellularis a varios agentes antimicrobianos. El derivado de pleuromutilina tiamulina exhibía una actividad moderada.

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que el agente de la invención es particularmente eficaz en la terapia de la enfermedad veterinaria cuya expresión se potencia por una densidad de almacenamiento incrementada, ileítis en cerdos (enteropatía proliferativa porcina; adenomatosis intestinal porcina) asociada con infección por *Lawsonia intracellularis*.

- 5 Además, aún más sorprendentemente, se ha encontrado que la inducción de resistencia al fármaco es extremadamente baja.

La invención trata así del uso veterinario que se definió anteriormente.

- 10 El animal que sufre enfermedades veterinarias cuya expresión se potencia al incrementar la densidad de almacenamiento puede, p. ej., ya no estar siendo tratado antibacterianamente con el agente de la invención, o ya no estar recibiendo el agente de la invención para la promoción del crecimiento.

Ileítis en cerdos asociada con infección por *Lawsonia intracellularis*:

- 15 La infección por *Lawsonia intracellularis* puede diagnosticarse de modo convencional, p. ej. según se describe en manuales veterinarios tales como Taylor, D.J., en *Pig Diseases*, 6ª Ed. (1995), Publ. D.J. Taylor, Glasgow, Reino Unido, en las páginas 154-157. La actividad beneficiosa del agente de la invención en este uso se determina, p. ej., como sigue:

1. Actividad in vitro:

Se sigue generalmente el método de Lawson, G.H.K. et ál., *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993) 1136-1142, con algunas modificaciones (los métodos de discos de Kirby-Bauer estándar no son aplicables a bacterias intracelulares):

- 20 Células: Monocapas de cultivos celulares de enterocitos de rata IEC-18 (ATCC CRL 1589) se establecen y se mantienen mediante métodos de cultivo celular estándar. Monocapas de un día de edad de células que se dividen (aprox. 30% de confluencia) se preparan para la infección el día 0, sobre cubreobjetos de vidrio en viales de cultivo pequeños (Tracs).

- 25 Inóculos: Lotes de tres cepas de *Lawsonia intracellularis* se usan como inóculos. Estos se derivan de cerdos afectados por enteropatía proliferativa, de las formas de enteropatía hemorrágica proliferativa (PHE) y adenomatosis intestinal porcina (PIA) preparadas a partir de intestinos de cerdo, y se someten pases en cultivos celulares, según se describe en la referencia de Lawson anterior. Las dos cepas de PHE se probaron parcialmente con respecto a la patogenicidad en cerdos, según se describe en McOrist, S. et ál., *Infect. Immun.* 61 (1993) 4286-4292. Los lotes de inóculo se recogen después de varios pases celulares, y se almacenan congelados a -70°C en viales de 1 ml. Los experimentos preliminares establecían diluciones apropiadas de viales descongelados que darían como resultado infecciones celulares fácilmente reconocibles en experimentos de cinco días.
- 30

Se prepararon antibióticos como soluciones de reserva concentradas 100 veces para cada uso. La actividad de cada lote de antibiótico se confirma mediante métodos de discos de Kirby-Bauer estándar con una cepa de laboratorio de *Escherichia coli*.

- 35 Infecciones: El día 0, un vial de cada cepa se descongela, se diluye 1/8 a 1/32 con medio de cultivo, para el uso en cuatro grupos 1 a 4.

Para el grupo 4 (tratamiento continuo) este inóculo se incuba inicialmente durante una hora a 37°C en medio de cultivo que contiene el antibiótico a diversas concentraciones antes de la adición a células.

- 40 Para el grupo 3 (actividad extracelular) este inóculo se prepara en medio de cultivo que contiene antibiótico a diversas concentraciones añadido inmediatamente antes del momento de adición a las células.

- 45 Para los grupos 1 (control) y 2 (actividad intracelular) los inóculos se prepararon en medio de cultivo libre de antibióticos y se añadieron a las células. Los viales de cultivo (Tracs) con células con inóculos añadidos (+/antibióticos) en un total de 0,5 ml de medio se ponen en botellas de acero, se evacúan hasta 40% de atmósfera (O₂ al 8%), se dejan durante 2 min, se reponen con hidrógeno y finalmente CO₂ al 10%. Los Tracs se retiran a continuación de estas botellas y se ponen en una incubadora graduada para proporcionar una atmósfera humidificada de O₂ al 8%, CO₂ al 8,8% y el resto nitrógeno, a 37°C.

Los días 1 y 2 todos los viales se retiran y se realimentan con medio reciente, que bien contiene antibióticos, grupos 2 y 4, o bien no, grupos 1 y 3, y se vuelven a colocar en la incubadora. El día 5, todos los cubreobjetos se retiran y

se tiñen con respecto a *Lawsonia intracellularis* mediante colorante de inmunoperoxidasa indirecto que incorpora un anticuerpo monoclonal específico. El número de células sobre cada cubreobjetos, muy infectadas con *Lawsonia intracellularis* (> 30 por célula, célula muy infectada = HIC) se usa como la principal medida de infección. También se apuntan el número de focos de HIC y observaciones celulares generales. HIC en el control (grupo 1), el ensayo de antibióticos intracelularmente activos (grupo 2), el ensayo de antibióticos extracelularmente activos (grupo 3) y el ensayo de tratamiento continuo (grupo 4) se comparan en ensayos por triplicado, para hasta 3 cepas cada uno. Algunos ensayos se repiten para diversas intensidades de los inóculos. Las relaciones porcentuales se calculan después de la derivación de las HIC medias de los controles pertinentes para el grupo de ensayo. HIC de control media es el número total de HIC en Tracs de control dividido por el número de Tracs de control infectados. La relación porcentual de los Tracs de ensayo se calcula a continuación al dividir su valor de HIC por la HIC de control media, multiplicado por 100 para dar un porcentaje. Esto es, los Tracs de ensayo en los que los antibióticos no tenían efecto tendrían una relación porcentual de alrededor de 100 y, cuando los antibióticos inhiben completamente el crecimiento, la relación sería 0.

Los resultados obtenidos con hidrocloreuro de valnemulina son como aparecen en la Tabla 1, que muestra el porcentaje de células que quedan sin infectar después del tratamiento.

Tabla 1

Relaciones porcentuales de infección por *Lawsonia intracellularis* de cultivos celulares con valnemulina añadida

Concentración de valnemulina (ch)	Grupo de cepa			Grupo de cepa		
	2	3	4	2	3	4
8	0	0	0	0,86	0,2	0,5
	0	0	0	0	0	1,4
	0	0	0	0	1,4	0,2
4				0	0	0,8
				0	0,83	2,5
				1,7	1,7	2,5
2	0	0	0			
	0	0	0			
	0	-	28			

ch = hidrocloreuro

Estos resultados indican que la concentración mínima de hidrocloreuro de valnemulina para provocar una inhibición significativa del crecimiento de *Lawsonia intracellularis* (<1% de crecimiento) es < 2 µg/ml.

2. Estudio de estimulación:

Treinta y cinco cerdos destetados son estimulados el mismo día con un inóculo virulento de *Lawsonia intracellularis* (cepa LR189/5/83), un aislado del agente causal de la enteropatía proliferativa porcina obtenido mediante cultivo en la línea celular de enterocitos de rata IEC-18 (ATCC CRL 1589), según se describe en Lawson et ál., J. Clin. Microbiol. 31 (1993) 1136-1142. Siete cerdos de control se dosifican con una solución tamponadora. Siete de los 21 cerdos estimulados se dejan sin tratar. Estos siete cerdos tenían guanacias de peso reducidas y todos desarrollaban lesiones de enteropatía proliferativa, detectadas en secciones de los intestinos tomadas por necropsia tres semanas después de la estimulación. Seis de estos 7 cerdos tenían lesiones claramente visibles, tres tenían diarrea de leve a moderada dos semanas después de la estimulación. Para probar una estrategia de dosificación de "prevención", otros dos grupos de cerdos estimulados son dosificados oralmente con hidrocloreuro de valnemulina a las dosis de 25 ppm y 75 ppm, respectivamente, (es decir, 1,25 mg/kg y 3,7 mg/kg) a través de una premezcla aportada dos días

antes de la estimulación, continuando hasta la eutanasia. Para probar una estrategia de “tratamiento”, otros dos grupos de cerdos estimulados son dosificados oralmente con 25 ppm y 75 ppm de valnemulina a través de una premezcla aportada siete días después de la estimulación, continuando hasta la eutanasia.

5 No eran visibles lesiones de enteropatía proliferativa en secciones de los intestinos tomadas por necropsia en 3 de 7 cerdos en el grupo de prevención y en 5 de 7 cerdos en el grupo de tratamiento. Los cerdos de control seguían normales. Por lo tanto, la valnemulina prevenía o trataba la enfermedad en una gran proporción de cerdos estimulados incluso a las bajas dosis reales de medicación recibidas.

10 Por lo tanto, el agente de la invención es útil en la terapia de la ileítis en cerdos asociada con infección por *Lawsonia intracellularis*. Para este uso, la dosificación eficaz, por supuesto, variará dependiendo de la sal particular empleada, el modo de administración, el tamaño y la edad del animal y el efecto deseado; por ejemplo, para el tratamiento profiláctico deberían administrarse dosis relativamente bajas a lo largo de mucho tiempo. Sin embargo, en general, se obtienen resultados satisfactorios cuando el agente se administra en una dosis diaria de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 6,5 mg/kg de peso corporal del animal, adecuadamente aportados ad libitum en agua o pienso, o en dosis divididas de dos a cuatro veces al día, o en forma de liberación sostenida. Para la mayoría de los animales la dosificación diaria total es de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1000 mg, preferiblemente de 15 mg a aproximadamente 500 mg, aportados una o dos veces al día.

Dosis preferidas en el agua de bebida son de 0,001 a 0,05% de peso en volumen, particularmente de 0,001 a 0,005%, y en el pienso de 20 a 400 g/tonelada métrica, particularmente de 20 a 200 g/tonelada métrica.

20 Para este uso el compuesto puede usarse en forma de base libre o en forma de sal veterinariamente aceptable, p. ej. una sal cuaternaria o, especialmente, una forma de sal de adición de ácido. Tales formas de sal exhiben el mismo orden de actividad que la forma de base libre. Ejemplos de sales de adición de ácido adecuadas son el hidrogenofumarato, el fumarato, el naftalino-1,5-sulfonato y especialmente el hidrocloreto.

25 El agente de la invención puede administrarse oralmente, localmente o parenteralmente y mezclarse con diluyentes y vehículos quimioterapéuticamente aceptables convencionales y, opcionalmente, otros excipientes, y administrarse en formas tales como comprimidos, cápsulas o preparaciones inyectables. También forma un excelente aditivo para mezclas de pienso (como premezcla) o para agua de bebida.

30 Vehículos veterinariamente aceptables preferidos incluyen, p. ej., excipientes farmacéuticos comúnmente usados como azúcar, almidón de maíz, lactosa, celulosa, así como sistemas portadores granulares y subproductos granulares como cáscaras de arroz trituradas, trigo triturado en bruto y harina de soja; por otra parte, diluyentes sólidos como piedra caliza triturada, sulfato sódico, carbonato cálcico y caolín, o sustancias líquidas como aceites veterinariamente aceptables (aceites vegetales o aceite mineral), propilenglicol y polietilenglicol. Adecuadamente, estas formulaciones se administran al animal oralmente, preferiblemente mezcladas en el pienso en forma de pienso harinoso medicado o pellas medicadas.

35 Para las aplicaciones en el agua de bebida, se usan soluciones en agua con o sin disolventes tales como etanol, propilenglicol, polietilenglicol, tensioactivos líquidos aprobados y sorbitol.

Para, p. ej., inyección intramuscular, la formulación se prepara típicamente como una solución en agua que puede contener disolventes como etanol o propilenglicol, o en un aceite veterinariamente aceptable. Ejemplos de aceites aceptables son aceite de sésamo, triglicéridos de cadena media (p. ej. Miglyol), miristato de isopropilo y oleato de etilo. La formulación puede contener conservantes, tampones y otros excipientes comunes.

40 Formulaciones veterinarias para el uso en la presente invención pueden prepararse al mezclar los ingredientes en las proporciones requeridas. A continuación, la formulación se envasa en un recipiente apropiado listo para la administración.

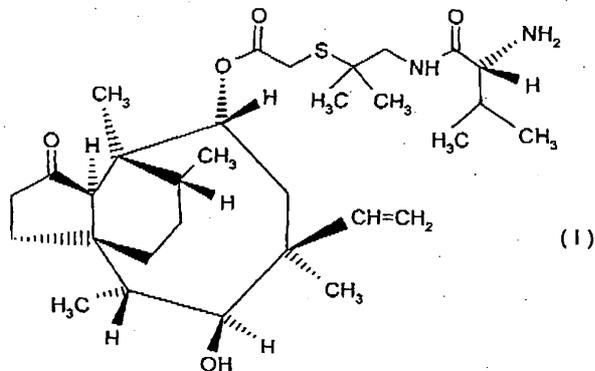
El siguiente Ejemplo ilustra la invención:

Ingrediente	Cantidad (g/100 ml)
hidrocloreto de valdemulina	10,0
fenol	0,5
Miglyol 840	hasta 100 ml

El agente de la invención es bien tolerado. La toxicidad aguda en la rata del compuesto de fórmula I en forma de sal de hidrocloreuro se determinó con dosis individuales de 1000 mg/kg y 2000 mg/kg oralmente administradas a 5 ratas macho y 5 hembra por grupo de dosis. Se producían muertes en 1-8 días. El valor de LD₅₀ obtenido es > 1000 mg/kg por vía oral.

REIVINDICACIONES

1. Uso del compuesto de fórmula I



5 en forma de base libre o de sal veterinariamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para la terapia de una enfermedad veterinaria cuya expresión se potencia al incrementar la densidad de almacenamiento, caracterizado porque la enfermedad veterinaria es ileítis en cerdos asociada con infección por *Lawsonia intracellularis*.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto de fórmula I está en la forma de la sal de adición de ácido hidrocioruro.