

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 231**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/541** (2006.01)

**A61P 33/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2009 E 09772098 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 2310017**

54 Título: **Nifurtimox para el tratamiento de enfermedades causadas por Trichomonadida**

30 Prioridad:

**02.07.2008 DE 102008031283**

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

**24.07.2013**

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH  
(100.0%)  
Alfred-Nobel-Strasse 10  
40789 Monheim , DT**

72 Inventor/es:

**HARDER, ACHIM;  
GREIF, GISELA y  
FROYMAN, ROBRECHT**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 415 231 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

Nifurtimox para el tratamiento de enfermedades causadas por Trichomonadida

La presente invención se refiere al uso de nifurtimox para el tratamiento de enfermedades causadas por Trichomonadida tales como, por ejemplo, la histomoniasis, particularmente en pavos.

5 En principio se conoce la eficacia de compuestos nitroheterocíclicos contra enfermedades protozoarias (1).

A los protozoos pertenecen los organismos mononucleares cuya estructura básica es una célula eucariota. Sin embargo, en la sistemática exacta existen grandes diferencias en el modo de vida, morfología y el metabolismo bioquímico de los filos, clases, géneros y especies individuales. Por tanto, las sustancias químicas actúan dependiendo de su diana y principio de acción habitualmente no de forma uniforme contra todos los protozoos, sino solamente contra grupos especiales de protozoos (2, 3, 4).

Hasta ahora, la eficacia del nifurtimox solamente se ha descrito contra especies de protozoos del género Trypanosoma, por ejemplo, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* (5, documento DE-AS-1 170 957). Los tripanosomas poseen un flagelo, que se origina en el cuerpo basal ("cinetosoma", por tanto, orden de los Kinetoplastida) y que configura junto con el cuerpo base una membrana ondulante. Los tripanosomas se reproducen sobre todo en el plasma sanguíneo y se transmiten mediante artrópodos chupadores de sangre. Estos patógenos causan la enfermedad de Chagas ("tripanosomiasis") del ser humano. Actualmente, el nifurtimox es prácticamente el único compuesto que actúa contra estos patógenos. Esta eficacia se basa probablemente en la inhibición de la tripanotióna reductasa, una enzima especial de los tripanosomas. Esta enzima falta en otros patógenos protozoarios, particularmente tricomonas e histomonas.

Dentro del orden de los Trichomonadida y Diplomonadida hasta ahora no se ha descrito la eficacia del nifurtimox. Los Trichomonadida son protozoos que viven de forma parasitaria sin excepción, para los que son típicos, por norma general, de 4 a 6 flagelos. Una gran particularidad morfológica es una barra contráctil (= costa) en el interior de los organismos, que participa en el movimiento. A diferencia de los cinetoplastidos, los Trichomonadida no poseen mitocondrias, que son orgánulos importantes del metabolismo energético. En lugar de esto, el metabolismo energético se realiza en los denominados hidrogenosomas. En estos orgánulos, la descarboxilación oxidativa del piruvato está acoplada a la síntesis de ATP y a un transporte de electrones controlado mediante ferredoxina (6). La reproducción de estos parásitos unicelulares se realiza mediante bipartición. No aparecen estadios sexuales o quistes. Al orden de los Trichomonadida pertenecen muchos géneros (particularmente los géneros Trichomonas e Histomonas) y, por lo demás, muchas especies, sin embargo, la mayoría de las mismas son más bien inocuas y apatógenas. A pesar de esto existen representantes que desencadenan graves enfermedades y que causan daños económicos importantes en la ganadería. A éstos pertenecen el género Trichomonas (particularmente *T. gallinae* y *T. gallinarum*), el género Tritrichomonas (particularmente *T. foetus* y *T. suis*) y el género Histomonas (particularmente *H. meleagridis*).

En el caso de la tricomoniasis de la paloma y de la gallina doméstica se trata de una enfermedad infecciosa causada por *Trichomonas gallinae* y *T. gallinarum*. *T. gallinae* parasita principalmente la faringe, el esófago y el buche. Sin embargo, en el transcurso de la enfermedad también se ven afectados otros órganos, sobre todo el hígado, el corazón y el pulmón. La infección de palomas jóvenes se realiza ya durante la primera alimentación con leche de buche de animales de mayor edad infectados de manera latente. Otras fuentes de infección son el agua de bebida o pienso contaminado. La enfermedad se considera la enfermedad de animales jóvenes más frecuente en palomas y causa grandes daños particularmente en poblaciones de cría. Además de la alta mortalidad aparecen alteraciones de la digestión, pérdida de apetito, una ingesta obstaculizada de agua de bebida y alimentos, así como una capacidad de vuelo limitada. *Trichomonas gallinarum* parasita el ciego de gallina y pavo. La enfermedad causa retrasos del crecimiento, diarreas graves, así como una inflamación necrótica del hígado.

En el caso de la histomoniasis se trata de una enfermedad infecciosa causada por *Histomonas meleagridis*. Las histomonas son parásitos intestinales. La histomoniasis tiene una particular importancia en pavos, en este caso se habla también de la denominada enfermedad de la cabeza negra. En pavos, la enfermedad se causa particularmente por el patógeno *Histomonas meleagridis*. Además del pavo, debido al patógeno también pueden enfermar gallinas, gallinas de Guinea, pavos reales, faisanes, perdices y codornices y se consideran huéspedes de tipo reservorio.

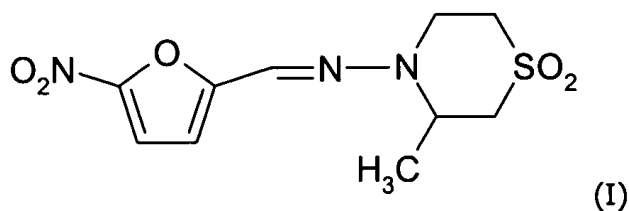
Debido a la infección por *Histomonas meleagridis* se produce una grave inflamación de ciego e hígado, ya que el patógeno daña el tejido intestinal y alcanza a través de la sangre el hígado, donde causa una formación de necrosis. Como un síntoma concomitante de la enfermedad aparece con frecuencia una insuficiencia circulatoria, que se puede reconocer en las cabezas negras-azules de animales enfermos, a las que la enfermedad debe su nombre.

En poblaciones de animales infectados, por ejemplo, en granjas de cría de aves, la enfermedad se propaga muy rápidamente a toda la población y conduce, debido a tasas de mortalidad muy altas (en circunstancias de hasta el 100 %), a grandes pérdidas económicas.

*Histomonas meleagridis* pertenece debido a sus flagelos estructurales al subfilo de los flagelados (Mastigophora) y al orden de los Trichomonadida. Los estadios flagelados se reproducen en el ciego mediante bipartición. Los estadios de tipo ameba penetran a través del torrente sanguíneo partiendo desde el ciego infectado en el hígado y destruyen el mismo mediante necrosis de gran superficie (7).

La transmisión de las histomonas de un modo directo, por ejemplo, la ingesta oral de heces frescas que contienen histomonas, es infrecuente, ya que los patógenos en el exterior de un huésped solamente son capaces de sobrevivir un breve tiempo y en la mayoría de los casos se destruyen durante el paso a través del tubo digestivo. Los ensayos de investigadores americanos dieron como resultado que en el ensayo animal una infección en pavos a través de la

- cloaca se realiza esencialmente de forma más sencilla que por vía oral. Como la cloaca después de la defecación genera una ligera succión, es probable una infección por esta vía en condiciones prácticas, por ejemplo, a través de cama contaminada. La transmisión de patógenos mediante huéspedes intermedios está demostrada científicamente de forma clara. Como transmisor (particularmente como vector de transporte de *Histomonas meleagridis*) se conoce sobre todo el gusano del ciego *Heterakis gallinarum* (huevos o larvas). En huevos embrionados de *Heterakis*, las histomonas pueden permanecer infecciosas hasta durante 4 años. Otros huéspedes intermedios pueden ser lombrices y artrópodos, que están contaminados con huevos de *Heterakis*. También las gallinas y otras especies de aves representan un peligro potencial. Son menos sensibles que los pavos y portan con frecuencia el patógeno sin ser clínicamente aparentes; de este modo contribuyen a la propagación del patógeno.
- Los pavos pueden infectarse a cualquier edad, sin embargo, la enfermedad aparece con más frecuencia entre la 3ª y 12ª semana de vida. El periodo de tiempo entre la infección y la aparición de la enfermedad asciende la mayoría de las veces a 7-12 días. La mortalidad puede ascender hasta al 100 % y alcanza su punto máximo el día 17 después de la infección. A partir del 8º día se pueden encontrar inflamaciones en el ciego, a partir del 10º día, en el hígado.
- Los animales infectados están decaídos y agotados, dejan caer alas y cabezas y rechazan la ingesta de pienso. Es típica la deposición de heces amarillo azufre, diarrea y posteriormente también presencia de sangre. Las alteraciones de la circulación que se producen con la enfermedad causan una marcada coloración negra-azul de la cabeza, que le dio su nombre a la enfermedad.
- El desarrollo de la enfermedad se determina en primera línea por la edad y la flora intestinal de los pavos. Las infecciones adicionales por bacterias con *E. coli*, *Clostridium perfringens* o coccidios pueden dificultar el desarrollo.
- El diagnóstico de la histomoniasis se puede realizar mediante preparados nativos de ciego e hígado con ayuda de una solución salina. Los estadios móviles de tipo ameba son visibles en el microscopio de contraste de fases. Histológicamente es habitual la tinción PAS.
- Hasta 1950, los compuestos de arsénico (por ejemplo, nitarsona, carbarsona, roxarsona) eran los únicos compuestos eficaces contra la histomoniasis. Sin embargo, se conoce que los compuestos de arsénico generalmente no son lo suficientemente fuertes para tratar infecciones ya establecidas. Una desventaja adicional es su índice de seguridad extremadamente bajo: incluso una dosificación doble de roxarsona conduce a funciones motoras alteradas en el pavo doméstico.
- Desde 1960 se utilizaron otros nitroimidazoles o nitrofuranos, por ejemplo, en el pienso o en el agua de bebida, sin embargo, a mitad de los años 90 se prohibieron de forma creciente por la UE y los EE.UU. para la aplicación en el animal de producción y como aditivo de piensos: el dimetridazol se retiró del mercado en 1997 en EE.UU. y se prohibió en 2001 para la utilización como aditivo de piensos en la UE. Desde el 31.3.2003 ahora ya tampoco se puede utilizar nifursol, el único producto todavía permitido en la UE, debido a consideraciones de seguridad. Por tanto, actualmente y en el futuro no están disponibles fármacos para la terapia ni preparados para combatir profilácticamente la histomoniasis.
- Las únicas estrategias disponibles actualmente para evitar una enfermedad están compuestas de medidas para la higiene, optimización de la densidad de población y del suministro de nutrientes así como la evitación de una propagación de patógenos. Estas medidas son insuficientes y en solitario no pueden evitar una infección y enfermedad.
- Las vacunas contra la histomoniasis no están disponibles. Por ejemplo, biológicamente no es posible una vacunación contra *Histomonas meleagridis*, ya que después de una infección no se puede adquirir tampoco una inmunidad natural. Los animales infectados una vez pueden enfermar de nuevo. Los intentos de inmunizar mediante vacunas vivas atenuadas no tuvieron éxito.
- Por tanto, existe una necesidad de principios activos para el tratamiento de enfermedades causadas por *Trichomonadida*, tales como, por ejemplo, la histomoniasis, que presenten una buena acción y buenas propiedades toxicológicas.
- Sorprendentemente, los inventores han hallado ahora la eficacia del nifurtimox contra *Trichomonadida*, presentando el nifurtimox también buenas propiedades toxicológicas. Esta eficacia no se había descrito hasta ahora y tampoco se esperaban las buenas propiedades toxicológicas.
- La invención se refiere a:
- El uso de nifurtimox para la fabricación de fármacos para el tratamiento de enfermedades causadas por *Trichomonadida*.
- El nifurtimox es el compuesto de la Fórmula (I):



Eventualmente también se considera la utilización en forma de sales farmacéuticamente compatibles habituales. Además se considera eventualmente también la utilización de hidratos u otros solvatos de los principios activos o eventualmente de sus sales.

5 La aplicación se puede realizar de forma tanto profiláctica como terapéutica. A los Trichomonadida pertenecen los géneros *Histomonas*, *Trichomonas*, *Tritrichomonas*. Del género *Trichomonas* se mencionan particularmente *T. gallinae* y *T. gallinarum*. Del género *Tritrichomonas* se mencionan particularmente *T. foetus*, *T. suis* y *T. equii*. Del género *Histomonas* se menciona particularmente *H. meleagridis*.

10 A los Diplomonadida pertenece el género *Hexamita*. Del género *Hexamita* se mencionan particularmente *H. columbae*, *H. meleagridis* y *H. salmonis*.

Se prefiere la lucha contra la histomoniasis. Está causada por *Histomonas* spp.. Es particularmente preferente la lucha de acuerdo con la invención contra la histomoniasis causada por *Histomonas meleagridis*. La eficacia del nifurtimox en la lucha contra la histomoniasis no está orientada solamente contra los estadios de patógenos del intestino, sino también contra los estadios en el hígado de los patógenos.

15 De acuerdo con la invención se tratan animales. Por ejemplo, se mencionan mamíferos, tales como, por ejemplo, vaca, caballo, cerdo, perro, gato. Preferentemente se tratan aves, tales como, por ejemplo, gallinas, gallinas de Guinea, perdices, codornices, patos, gansos, pavos reales, faisanes, palomas y particularmente pavos (en el presente documento de forma sinónima con pavos domésticos).

De forma ilustrativa se resaltan las siguientes enfermedades:

20 Tricomoniasis de la paloma, del pavo o de la gallina doméstica, causada por *T. gallinarum* y/o *T. gallinae*.

Histomoniasis en gallinas, gallinas de Guinea, pavos reales, faisanes, perdices, codornices y particularmente en el pavo. La histomoniasis en pavos (enfermedad de la cabeza negra) se causa particularmente por *H. meleagridis*.

La aplicación de los principios activos se realiza directamente o en forma de preparaciones adecuadas por vía entérica, parenteral, dérmica.

25 La aplicación entérica de los principios activos tiene lugar, por ejemplo, por vía oral en forma de polvos, supositorios, comprimidos, cápsulas, pastas, bebidas, granulados, pociones, bolos, pienso medicado o agua de bebida. La aplicación dérmica tiene lugar, por ejemplo, en forma de inmersión (sumersión), pulverización (nebulización), baño, lavado, vertido (unción dorsal y unción en la cruz) y del empolvado. La aplicación parenteral tiene lugar, por ejemplo, en forma de inyección (intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal) o mediante implantes.

30 Son preparaciones adecuadas:

soluciones, tales como soluciones para inyección, soluciones orales, concentrados para la administración oral después de la dilución, soluciones para el uso sobre la piel o en cavidades corporales, formulaciones de vertido, geles;

35 emulsiones y suspensiones para la aplicación oral o dérmica así como para la inyección; preparaciones semisólidas;

formulaciones, en las que el principio activo está procesado en una base de pomada o en una base de emulsión de aceite en agua o de agua en aceite;

preparaciones sólidas, tales como polvos, premezclas o concentrados, gránulos, miniesferas, comprimidos, bolos, cápsulas; aerosoles e inhalaciones, cuerpos de moldeo que contienen principio activo.

40 Las soluciones para inyección se administran, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular y subcutánea.

Las soluciones orales se aplican directamente. Los concentrados se aplican por vía oral después de dilución previa hasta la concentración de aplicación.

Las soluciones para el uso sobre la piel se aplican gota a gota, extienden, untan, rocían, pulverizan o se aplican mediante inmersión (sumersión), baño o lavado.

45 Los geles se aplican o extienden sobre la piel o se introducen en cavidades corporales.

Las formulaciones de vertido se vierten o pulverizan sobre zonas limitadas de la piel, penetrando el principio activo a

través de la piel y actuando sistémicamente o distribuyéndose sobre la superficie corporal. Las emulsiones son del tipo agua en aceite o del tipo aceite en agua y se pueden aplicar por vía oral, dérmica o como inyecciones.

Las suspensiones se pueden aplicar por vía oral, dérmica o como inyección.

5 Las preparaciones semisólidas se pueden administrar por vía oral o dérmica. Se diferencian de las suspensiones y emulsiones que se han descrito anteriormente solamente por su mayor viscosidad.

Para la fabricación de preparaciones sólidas, los principios activos se mezclan con vehículos adecuados eventualmente con adición de coadyuvantes y se llevan hasta la forma deseada.

De acuerdo con la invención es particularmente preferente la aplicación en aves de corral. Ésta se realiza preferentemente por vía oral, particularmente mediante pienso medicado o mediante el agua de bebida.

10 Todas las formas farmacéuticas que se han mencionado anteriormente, los aditivos y adyuvantes a usar así como la fabricación de estos fármacos básicamente se conocen por el experto.

Los principios activos pueden estar presentes en combinación con sinergistas o con otros principios activos. Como otros principios activos se mencionan:

15 coccidiostáticos, tales como robenidina o amprolio, en parte en combinación con antagonistas de ácido fólico (por ejemplo, etopabato, pirimetamina, epiroprim);

antibióticos de poliéter, tales como monensina, salinomina, lasalocid, narasina, semduramicina o maduramicina;

triazinonas, tales como toltrazurilo, ponazurilo o diclazurilo;

sulfonamidas (sulfaquinoxalina, sulfadimidina, sulfadiazina);

20 Para un efecto de tratamiento a largo plazo es recomendable desinfectar la explotación ganadera antes de la introducción de los animales o después de la finalización del periodo de cebo.

25 Los helmintos, particularmente *Heterakis spp. (Larvas)* (9) funcionan como vectores de transporte en la transmisión de las histomonas. Durante el tratamiento de la histomoniasis, por tanto, puede ser razonable un tratamiento de combinación con antihelmínticos. De este modo se conoce que los antihelmínticos, tales como, por ejemplo, los bencimidazoles albendazol o fenbendazol, son eficaces *in vivo* profilácticamente cuando se trata a partir de la infección. Es habitual un tratamiento antihelmíntico durante 14 días a partir del momento de la infección. Mediante un tratamiento combinado con nifurtimox y antihelmínticos, por tanto, se puede conseguir un tratamiento mejorado de enfermedades causadas por tricomonas.

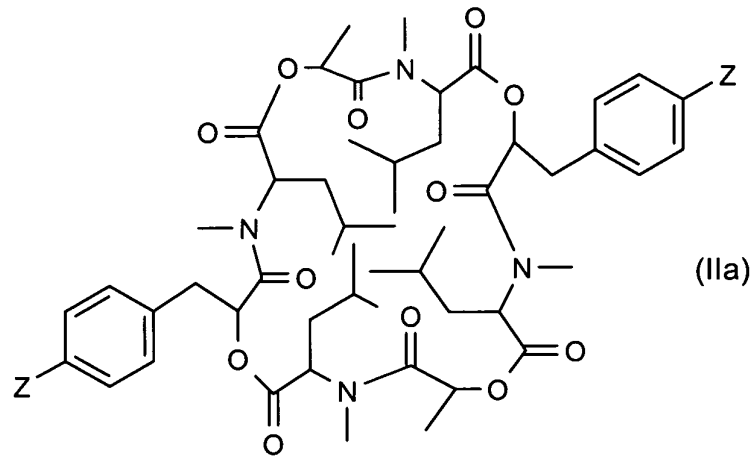
30 Como antihelmínticos se mencionan bencimidazoles, tales como albendazol, fenbendazol o probencimidazol, tales como febantel. Estas sustancias son eficaces, por ejemplo, contra *Heterakis spp.*, particularmente contra *Heterakis gallinarum*, que funciona de forma conocida como vector de transporte de *Histomonas meleagridis* (10).

35 Por lo demás, se mencionan imidazoltiazoles (levamisol, tetramisol), tetrahidropirimidinas (pirantel, morantel, oxantel), derivados de amidina, por ejemplo, amidantel, tribendimidina así como el derivado de amidantel desacilado Bay d 9216 y derivados de aminoacetónitrilo (véase, por ejemplo, Kaminsky y col. *Nature* 452, 176-180 (13 de marzo de 2008), tales como, por ejemplo, AAD 1470.

40 Entre los antihelmínticos se mencionan preferentemente los antihelmínticos de depsipéptido. Los antihelmínticos de depsipéptido, tales como el PF1022A y el emodépsido, tienen una amplia eficacia antihelmíntica contra nematodos en diferentes especies animales, tales como gallináceas, roedores, reptiles, perros, gatos, ovejas, vacas, cabras, caballos (11, 12, 13, 14). A este respecto se pudo demostrar que PF1022A y emodépsido son eficaces contra nematodos de la superfamilia de los Heterakoidea. A estos pertenecen, por ejemplo, de la familia de los Heterakidae, además de *Heterakis gallinarum* en la gallina, el nematodo de ratón *Heterakis spumosa*. Contra el último, PF1022A es eficaz, por ejemplo, a una dosis oral de 50 mg/kg así como emodépsido, por ejemplo, en el intervalo de dosis de 1-10 mg/kg (13, 15). Además, de forma demostrada, por ejemplo, PF1022A es eficaz contra un representante adicional de la superfamilia Heterakoidea, *Ascaridia galli* en la gallina, que pertenece a la familia de las Ascaridiidae. En este caso actúa el compuesto a una dosificación de 2 mg/kg (16). Estas sustancias de la clase de compuestos de los depsipéptidos cíclicos, por tanto, son adecuadas para combatir profilácticamente particularmente la histomoniasis.

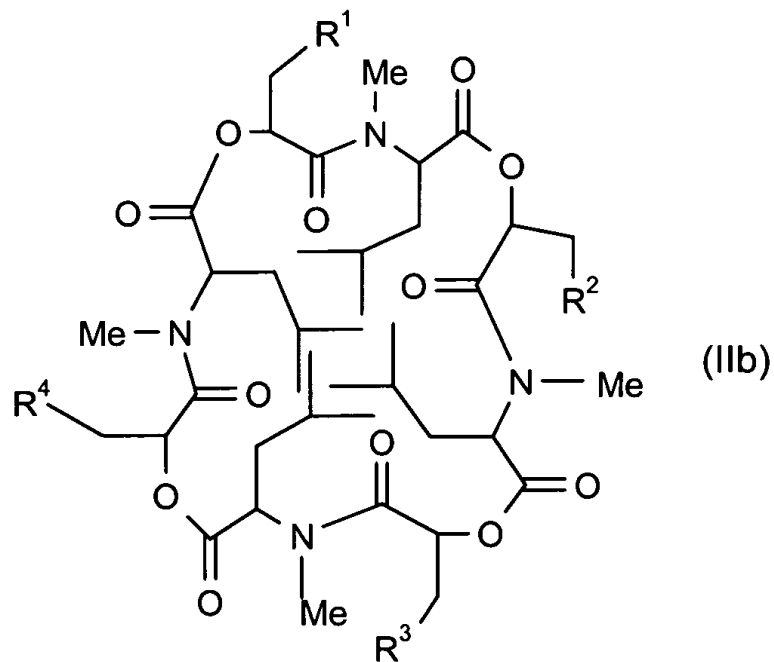
45 Los antihelmínticos de depsipéptido utilizados preferentemente son ciclodepsipéptidos de 24 miembros. Como tales se mencionan:

50 Compuestos de la fórmula (IIa)



en la que

Z representa hidrógeno, *N*-morfolinilo, NH<sub>2</sub>, mono- o dimetilamino. Además se mencionan compuestos de la siguiente fórmula (IIb):



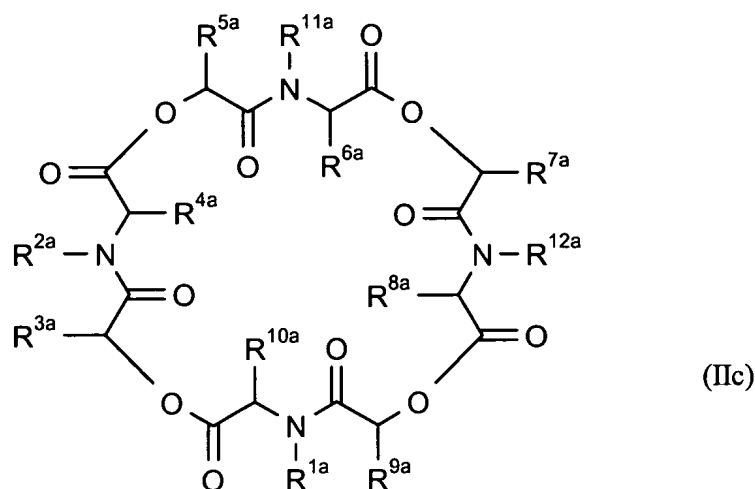
5

en la que

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> representan independientemente entre sí hidrógeno, alquilo o arilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, particularmente fenilo, que eventualmente están sustituidos con hidroxilo, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> o halógeno.

10 Los compuestos de la fórmula general (IIb) se conocen y se pueden obtener de acuerdo con los procedimientos descritos en los documentos EP-A-382 173, DE-A 4 137 432, DE-A 4 317 457, DE-A 4 317 458, EP-A-634 408, EP-A-718 293, EP-A-872 481, EP-A-685 469, EP-A-626 375, EP-A-664 297, EP-A-669 343, EP-A-787 141, EP-A-865 498, EP-A-903 347.

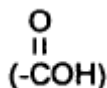
A los depsipéptidos cíclicos con 24 átomos de anillo pertenecen también compuestos de la fórmula general (IIc)



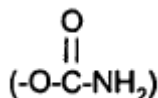
en la que

$R^{1a}$ ,  $R^{2a}$ ,  $R^{11a}$  y  $R^{12a}$  representan independientemente entre sí alquilo  $C_{1-8}$ , halogenoalquilo  $C_{1-8}$ , cicloalquilo  $C_{3-6}$ , aralquilo, arilo,

- 5  $R^{3a}$ ,  $R^{5a}$ ,  $R^{7a}$  y  $R^{9a}$  representan independientemente entre sí hidrógeno o alquilo  $C_{1-8}$  lineal o ramificado, que eventualmente puede estar sustituido con hidroxilo, alcoxi  $C_{1-4}$ , carboxilo,



, carboxamida,



- 10 , imidazolilo, indolilo, guanidino, -SH o alquiltio  $C_{1-4}$  y además arilo o aralquilo, que pueden estar sustituidos con halógeno, hidroxilo, alquilo  $C_{1-4}$ , alcoxi  $C_{1-4}$ ,

$R^{4a}$ ,  $R^{6a}$ ,  $R^{8a}$  y  $R^{10a}$  representan independientemente entre sí hidrógeno, alquilo  $C_{1-5}$  lineal, alqueno  $C_{2-6}$ , cicloalquilo  $C_{3-7}$ , que eventualmente pueden estar sustituidos con hidroxilo, alcoxi  $C_{1-4}$ , carboxilo, carboxamida, imidazolilo, indolilo, guanidino, SH o alquiltio  $C_{1-4}$ , así como arilo o aralquilo, que pueden estar sustituidos con halógeno, hidroxilo, alquilo  $C_{1-4}$ , alcoxi  $C_{1-4}$ , así como sus isómeros ópticos y racematos.

- 15 Los compuestos preferentes de la fórmula (IIc) son aquellos en los que  $R^{1a}$ ,  $R^{2a}$ ,  $R^{11a}$  y  $R^{12a}$  representan independientemente entre sí metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-, *s*-, *t*-butilo o fenilo, que eventualmente está sustituido con halógeno, alquilo  $C_{1-4}$ , OH, alcoxi  $C_{1-4}$ , así como bencilo o feniletilo, que eventualmente pueden estar sustituidos con los restos indicados en fenilo;

- 20  $R^{3a}$  a  $R^{10a}$  tienen el significado que se ha indicado anteriormente.

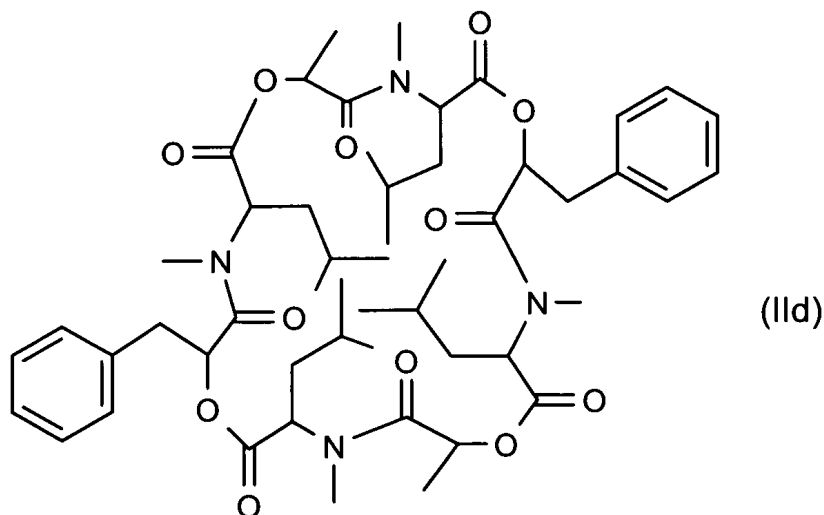
Los compuestos particularmente preferentes de la fórmula (IIc) son aquellos en los que  $R^{1a}$ ,  $R^{2a}$ ,  $R^{11a}$  y  $R^{12a}$  representan independientemente entre sí metilo, etilo, propilo, isopropilo o *n*-, *s*-, *t*-butilo,

- 25  $R^{3a}$ ,  $R^{5a}$ ,  $R^{7a}$ ,  $R^{9a}$  representan hidrógeno, alquilo  $C_{1-8}$  lineal o ramificado, particularmente metilo, etilo, propilo, *i*-propilo, *n*-, *s*-, *t*-butilo que eventualmente pueden estar sustituidos con alcoxi  $C_{1-4}$ , particularmente metoxi, etoxi, imidazolilo, indolilo o alquiltio  $C_{1-4}$ , particularmente metiltio, etiltio, además fenilo, bencilo o feniletilo, que eventualmente pueden estar sustituidos con halógeno, particularmente cloro.

$R^{4a}$ ,  $R^{6a}$ ,  $R^{8a}$ ,  $R^{10a}$  representan independientemente entre sí hidrógeno, metilo, etilo, *n*-propilo, *n*-butilo, vinilo, ciclohexilo, que eventualmente pueden estar sustituidos con metoxi, etoxi, imidazolilo, indolilo, metiltio, etiltio, así como isopropilo, *s*-butilo, además fenilo, bencilo o feniletilo eventualmente sustituido con halógeno.

- 30 Los compuestos de la Fórmula (IIc) se pueden obtener asimismo de acuerdo con los procedimientos descritos en los documentos EP-A-382 173, DE-A 4 317 432, DE-A 4 317 457, DE-A 4 317 458, EP-A-634 408, EP-A-718 293, EP-A-872 481, EP-A-685 469, EP-A-626 375, EP-A-664 297, EP-A-669 343, EP-A-787 141, EP-A-865 498, EP-A-903 347.

Como un depsipéptido muy particularmente preferente se menciona el compuesto PF 1022 conocido por el documento EP-OS 382 173, se trata del compuesto de la Fórmula (IIa) en la que ambos sustituyentes Z representan hidrógeno. Por tanto, PF 1022 tiene la siguiente fórmula (IIc):

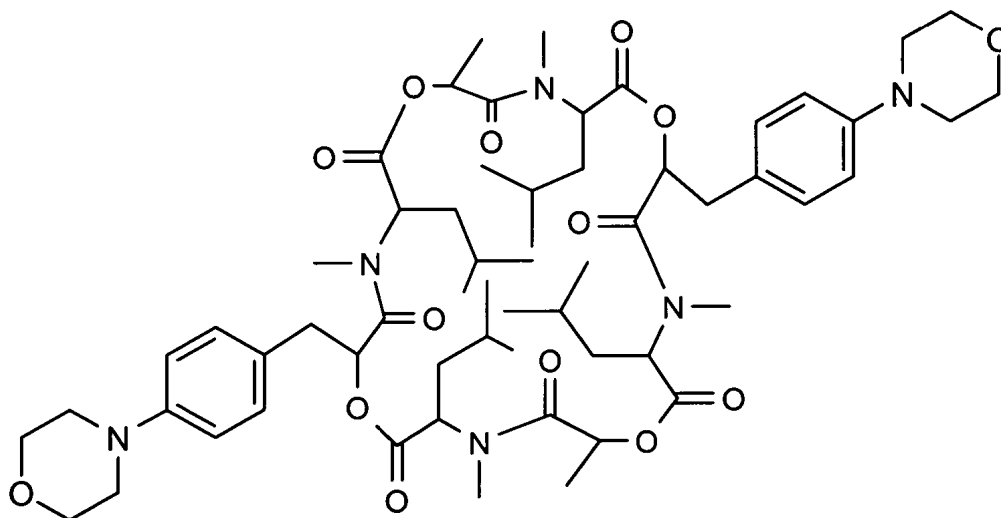


5 Otros depsipéptidos preferentes son compuestos que se conocen por la Solicitud PCT WO 93/19053 y, de hecho, compuestos de la Fórmula (IIa),

en la que

Z representa *N*-morfolinilo, NH<sub>2</sub>, mono- o dimetilamino.

10 De estos compuestos se prefiere muy particularmente el depsipéptido emodépsido (PF 1022-221). Se trata del compuesto de la fórmula (IIa) en la que ambos restos Z representan el resto morfolinilo. La DCI emodépsido representa el compuesto con el nombre sistemático: ciclo[(*R*)-lactoil-*N*-metil-*L*-leucil-(*R*)-3-(*p*-morfolinofenil)lactoil-*N*-metil-*L*-leucil-(*R*)-lactoil-*N*-metil-*L*-leucil-(*R*)-3-(*p*-morfolinofenil)lactoil-*N*-metil-*L*-leucilo. El emodépsido está descrito en el documento WO 93/19053 y tiene la siguiente fórmula:



15 Los principios activos adecuados para la combinación que se han mencionado anteriormente pueden estar presentes dependiendo de la estructura en formas estereoisoméricas o como mezclas de estereoisómeros, por ejemplo, como enantiómeros o racematos. Tanto las mezclas de estereoisómeros como los estereoisómeros puros se pueden usar de acuerdo con la invención.

20 Además se pueden usar eventualmente: sales de los principios activos con ácidos o bases farmacéuticamente aceptables y también solvatos, particularmente hidratos, de los principios activos o de sus sales.

La aplicación en combinación significa que el nifurtimox y el segundo activo, particularmente un ciclodepsipéptido, se pueden aplicar de forma separada o escalonada en el tiempo. En este caso, el nifurtimox y el segundo principio activo están formulados respectivamente como fármacos independientes.



También se puede concebir la aplicación simultánea. De acuerdo con una realización adecuada para este caso, los principios activos de la combinación están formulados de forma conjunta en un agente.

Las preparaciones listas para la aplicación contienen el respectivo principio activo habitualmente en concentraciones de 10 ppm hasta el 20 % en peso, preferentemente del 0,1 al 10 % en peso.

5 Las preparaciones que se diluyen antes de la aplicación contienen el respectivo principio activo en concentraciones del 0,5 al 90 % en peso, preferentemente del 5 al 50 % en peso. En soluciones concentradas para la dosificación en el agua de bebida, el respectivo principio activo se encuentra, por ejemplo, en concentraciones del 0,5 al 20 % en peso, preferentemente del 1 al 15 % en peso, particularmente preferentemente del 2 al 10 % en peso.

10 Generalmente se ha demostrado que es ventajoso administrar cantidades de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 200 mg, preferentemente de 0,1 a 100 mg de principio activo por kg de peso corporal por día para la obtención de resultados eficaces.

En la mezcla con otros agentes para coccidiosis y antibióticos de poliéter, los principios activos de acuerdo con la invención están presentes por regla general en una proporción de peso de 1 a 0,01 - 50 a 1 a 1 - 50.

Los principios activos también se pueden administrar junto con el pienso o el agua de bebida de los animales.

15 El pienso y los alimentos contienen de 0,005 a 1000 ppm, preferentemente de 0,05 a 500 ppm del principio activo en combinación con un material comestible adecuado.

Un pienso o alimento de este tipo se puede usar tanto para fines de curación como para fines profilácticos.

20 La producción de un pienso o alimento de este tipo se realiza mediante mezcla de un concentrado o una premezcla que contiene del 0,5 al 30 %, preferentemente del 1 al 20 % en peso de un principio activo mezclado con un vehículo orgánico o inorgánico comestible con piensos habituales. Los vehículos comestibles son, por ejemplo, harina de maíz o harina de maíz y semillas de soja o sales minerales, que contienen preferentemente una reducida cantidad de un aceite antipolvo comestible, por ejemplo, aceite de maíz o aceite de soja. La premezcla obtenida de este modo puede añadirse entonces al pienso completo antes de su suministro a los animales.

De forma ilustrativa se describe la utilización en la histomoniasis:

25 para la curación y la profilaxis de la histomoniasis en aves, particularmente en gallinas, patos, gansos o pavos domésticos se mezclan de 0,005 a 1000 ppm, preferentemente de 0,05 a 500 ppm de un principio activo con un material comestible adecuado, por ejemplo, un pienso nutritivo. En el caso de que se desee, estas cantidades se pueden aumentar, particularmente cuando el principio activo se tolera bien por el receptor. De forma correspondiente, la administración se puede realizar mediante el agua de bebida.

30 A pesar de esto, temporalmente puede ser necesario apartarse de las cantidades mencionadas, particularmente dependiendo del peso corporal del animal de ensayo o del tipo del procedimiento de administración, pero también debido al género animal y su reacción individual al principio activo o el tipo de la formulación y el momento o la separación en el o con la que se administra. De este modo, en ciertos casos puede ser suficiente trabajar con menos de la cantidad mínima que se ha mencionado anteriormente, mientras que en otros casos se tiene que superar el límite superior que se ha mencionado. Con la administración de mayores cantidades puede ser apropiado dividir las mismas a lo largo del día en varias administraciones individuales.

35 La eficacia de los compuestos de acuerdo con la invención se puede demostrar, por ejemplo, en ensayos de jaula con la siguiente disposición de ensayo, en la que los animales se tratan con el respectivo principio activo.

40 Un pienso que contiene principio activo se prepara mezclando cuidadosamente la cantidad requerida de principio activo con un pienso animal equilibrado en cuanto a nutrientes, por ejemplo, con el pienso para pollitos indicado a continuación.

45 Cuando se deba preparar un concentrado o una premezcla que se tiene que diluir finalmente en el pienso hasta los valores mencionados en el ensayo, se mezclan generalmente de aproximadamente el 1 al 30 %, preferentemente de aproximadamente el 10 al 20 % de principio activo con un vehículo orgánico o inorgánico comestible, por ejemplo, harina de maíz y soja o sales minerales, que contienen una pequeña cantidad de un aceite de desempolvadura comestible, por ejemplo, aceite de maíz o aceite de semilla de soja. La premezcla obtenida de este modo se puede añadir entonces al pienso para aves completo antes de la administración.

50 Como ejemplo del uso de los agentes de acuerdo con la invención en el pienso para aves se considera la siguiente composición.

52,00 %	cereales forrajeros triturados, y de hecho: maíz al 40 %, trigo al 12 %
17,00 %	soja triturada extr.
5,00 %	harina de gluten de maíz
5,00 %	harina de trigo para pienso
3,00 %	harina de pescado
3,00 %	mezcla de minerales
3,00 %	harina de alfalfa
2,50 %	premezcla de vitaminas
2,00 %	gérmenes de trigo, molidos
2,00 %	aceite de soja
2,00 %	harina de huesos de carne
1,50 %	polvo de suero de leche
1,00 %	melaza
1,00 %	levadura de cerveza, unida a orujo
<hr/>	
100,00 %	

Un pienso de este tipo contiene proteína bruta al 18 %, fibra bruta al 5 %, Ca al 1 %, P al 0,7 % así como por kg 1200 U.I. de Vitamina A, 1200 U.I. de Vitamina D3, 10 mg de Vitamina E, 20 mg de bacitracina de cinc.

**Bibliografía:**

- 5 1. Raether W., Hänel H (2003): Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity Parasitol Res. 90: S19-S39.
2. Harder A., Greif G., Haberkorn A. (2001a): Chemotherapeutic approaches to protozoa: Haemosporina – current level of knowledge and outlook.
3. Harder A., Greif G., Haberkorn A. (2001b): Chemotherapeutic approaches to protozoa: Giardia, Trichomonas and Entamoeba – current level of knowledge and outlook.
- 10 4. Greif G., Harder A., Haberkorn A. (2001): Chemotherapeutic approaches to protozoa: Coccidiae – current level of knowledge and outlook.
5. Harder A., Greif G., Haberkorn A. (2001c): Chemotherapeutic approaches to protozoa: Kinetoplastida – current level of knowledge and outlook. Parasitol Res 87: 778-780.
- 15 6. Kulda J. (1999): Trichomonas, hydrogenosomes and drug resistance. International Journal for Parasitology 29: 199-212
7. McDougald L. R. (2005): Blackhead Disease (Histomoniasis) in Poultry: A critical Review. Avian Diseases 49(4): 462-476.
8. McDougald, L. R., Hu, J. (2001): Blackhead Disease (*Histomonas meleagridis*) aggravated in broiler chickens by concurrent infection with cecal coccidiosis (*Eimeria tenella*). Avian Diseases 45: 307-312
- 20 9. Hegngi F. N., Doerr J., Cummings T. S., Schwartz R. D., Saunders G., Zajac A., Larsen C. T., Pierson F. W. (1999): The effectiveness of benzimidazole derivatives for the treatment and prevention of histomonosis (blackhead) in turkeys. Veterinary Parasitology 81: 29-37.
10. Hegngi, F. N., Doeerr, J., Cummings, T. S., Schwartz, R. D., Saunders, G., Zajac, A., Larsen, C. T., Pierson, F. W. (1999): The effectiveness of benzimidazole derivatives for the treatment and prevention of histomonosis (blackhead) in turkeys. Veterinary Parasitology 81: 29-37.
- 25 11. von Samson-Himmelstjerna G., Harder A., Schnieder T., Kalbe J., Mencke N. (2000): In vivo activities of the new anthelmintic depsipeptide PF1022A. Parasitol. Res. 86: 194-199.
12. Mehlhorn H., Nicolay F., Harder A., von Samson-Himmelstjerna A. (2000): Synergistic action of Bay 44-4400 and piperazine on nematodes of the mouse in vitro and in vivo: a light and transmission electron microscopic study. Parasitol. Res. 86: 982-992
- 30 13. Harder A., Schmitt-Wrede H.-P., Krücken, J., Marinovski P., Wunderlich F., Willson J., Amliwala K., Holden-Dye L., Walker R. (2003): Cyclooctadepsipeptides – an anthelmintically active class of compounds exhibiting a novel mode of action. Int. J. Antimicrobial Agents 22: 318-331.

14. Mehlhorn H., Schmahl G., Frese M., Mevissen I., Harder A., Krieger K. (2005): Effects of a combination emodepside and praziquantel on parasites of reptiles and rodents. *Parasitol. Res.* 97: Supl 1: S65-S69

5 15. Bernt U., Junkersdorf B., Londershausen M., Harder A., Schierenberg E. (1998): Effects of anthelmintics with different modes of action on the behaviour and development of *Caenorhabditis elegans*. *Fundam. Appl. Nematol.* 21: 251-263.

16. Sasaki T, Takagi M, Yaguchi T, Miyadoh S, Okada T, Koyama S (1992) A new anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A. *Journal of Antibiotics* 45: 692-697

**Ejemplo**

**Piensos medicados**

10 Mediante mezcla de nifurtimox en forma de polvo en concentraciones de 50, 100, 200 y 400 ppm en la mezcla de pienso que se indica a continuación se pueden producir piensos medicados.

52,00 %	cereales forrajeros triturados, y de hecho: maíz al 40 %, trigo al 12 %
17,00 %	soja triturada extr.
5,00 %	harina de gluten de maíz
5,00 %	harina de trigo para pienso
3,00 %	harina de pescado
3,00 %	mezcla de minerales
3,00 %	harina de alfalfa
2,50 %	premezcla de vitaminas
2,00 %	gérmenes de trigo, molidos
2,00 %	aceite de soja
2,00 %	harina de huesos de carne
1,50 %	polvo de suero de leche
1,00 %	melaza
1,00 %	levadura de cerveza, unido a residuos de cervecería
<hr/>	
100,00 %	

**Comprimidos**

Los comprimidos de nifurtimox son conocidos y están disponibles, por ejemplo, con el nombre comercial Lampit® como fármaco.

15 **A. Ejemplo biológico: ensayos de jaula, eficacia contra histomonas en pavos**

Pavos macho de 10 días de edad sin histomonas reciben a partir del día -4 (= 4 días antes de la infección) hasta el día 14 nifurtimox o el compuesto comparativo nitarsona en la concentración indicada en "ppm" con el pienso. La infección se realiza el día 0. En cada jaula de grupo se alojan 10 animales. Por dosificación se utilizan de 1 a 3 de tales grupos.

20 La infección se realiza con una cepa de campo de histomonas, que se somete a pases en el laboratorio y se almacena en nitrógeno líquido. El día 0 se infectan respectivamente 5 animales de una jaula (excepto el control no infectado) por vía intracloacal con 250.000 histomonas en respectivamente 1 ml de medio de Dwyer's (= infección directa). Estos animales infectados excretan después de pocos días nuevas histomonas y transmiten por tanto el patógeno a los restantes 5 animales de la jaula (= infección indirecta).

25 Para la evaluación de la eficacia se tienen en cuenta los criterios de acuerdo con Mc Dougald y Hu 2001 (7):

- la tasa de mortalidad debida a infección
- el aumento de peso desde el comienzo del ensayo hasta el final del ensayo
- ingesta de pienso
- conversión alimenticia

30 - evaluación macroscópica de las lesiones dependientes de la infección en los ciegos (caecum) y en el hígado. En esta valoración significan "puntuación 0" = ninguna lesión y "puntuación 4" = lesiones graves.

**Tabla 1: diseño de estudio de 210 animales**

Grupo	Código	Tratamiento			Infección
		Compuesto	Concentración	Día	
no inf.	D	no tratado	-	-	-
contr. inf.	F	no tratado	-	-	+
30 ppm	E	nifurtimox	30 ppm	de -4 a +14	+
60 ppm	B	nifurtimox	60 ppm	de -4 a +14	+
120 ppm	C	nifurtimox	120 ppm	de -4 a +14	+
200 ppm	G	nifurtimox	200 ppm	de -4 a +14	+
nita.	A	nitarsona	187,5 ppm	de -4 a +14	+

**Tabla 2: diseño de estudio de 210 animales**

Grupo	Código	Tratamiento			Infección
		Compuesto	Concentración	Día	
no inf.	G	no tratado	-	-	-
contr. inf.	A	no tratado	-	-	+
100 ppm	D	nifurtimox	100 ppm	de -4 a +14	+
200 ppm	F	nifurtimox	200 ppm	de -4 a +14	+
300 ppm	B	nifurtimox	300 ppm	de -4 a +14	+
400 ppm	C	nifurtimox	400 ppm	de -4 a +14	+
nita.	E	nitarsona	187,5 ppm	de -4 a +14	+

5

**Tabla 3: mortalidad causada por histomoniasis**

Tratamiento	Mortalidad	Tratamiento	Mortalidad
contr. inf.	7	contr. inf.	11
30 ppm	5	100 ppm	13
60 ppm	6	200 ppm	4
120 ppm	5	300 ppm	2
200 ppm	4	400 ppm	0
nita.	1	nita.	2

**Tabla 4: aumento medio de peso (g) entre el día 0 y el momento de la muerte**

Tratamiento	Infección Directa		Tratamiento	Infección Directa	
	no	sí		no	sí
no inf.	791		no inf.	819	
contr. inf.	741	197	contr. inf.	666	259
30 ppm	730	235	100 ppm	581	135
60 ppm	838	304	200 ppm	525	270

(continuación)

120 ppm	744	182	300 ppm	750	450
200 ppm	744	264	400 ppm	832	691
nita.	782	541	nita.	725	426

**Tabla 5: consumo medio de pienso entre el día 0 y el día 14**

Tratamiento	Consumo de pienso (kg)		Tratamiento	Consumo de pienso (kg)
control no inf.	12,01		control no inf.	12,44
control infectado	8,84		control infectado	9,56
30 ppm	9,00		100 ppm	6,69
60 ppm	9,68		200 ppm	9,14
120 ppm	8,70		300 ppm	10,40
200 ppm	9,59		400 ppm	11,79
nita.	11,64		nita.	9,82

5

**Tabla 6: conversión alimenticia media entre el día 0 y el día 14**

Tratamiento	Conversión alimenticia		Tratamiento	Conversión alimenticia
control no inf.	1,52		control no inf.	1,63
control infectado	1,89		control infectado	2,10
30 ppm	1,88		100 ppm	2,32
60 ppm	1,70		200 ppm	2,33
120 ppm	1,88		300 ppm	1,83
200 ppm	1,91		400 ppm	1,55
nita.	1,77		nita.	1,79

**Tabla 7: lesiones medias en el ciego**

Tratamiento	Infección Directa		Tratamiento	Infección Directa	
	no	sí		no	sí
control no inf.	0,03		control no inf.	0,00	
control inf.	0,29	3,93	control inf.	0,93	2,93
30 ppm	0,29	3,73	100 ppm	1,08	3,79
60 ppm	0,00	3,53	200 ppm	1,80	3,67
120 ppm	0,53	4,00	300 ppm	0,79	2,53
200 ppm	0,47	3,80	400 ppm	0,27	1,20
nita.	0,00	2,26	nita.	0,29	3,07

Tabla 8: lesiones dependientes de la infección en el hígado

Tratamiento	Infección Directa		Tratamiento	Infección Directa	
	no	sí		no	sí
no inf.	0,00		no inf.	0,00	
contr. inf.	0,29	3,47	contr. inf.	0,14	1,80
30 ppm	0,29	2,53	100 ppm	0,58	2,00
60 ppm	0,00	2,53	200 ppm	0,73	1,33
120 ppm	0,27	1,80	300 ppm	0,07	0,40
200 ppm	0,13	1,33	400 ppm	0,00	0,00
nita.	0,00	0,13	nita.	0,21	0,79

### B. Ejemplo biológico: propiedades antihelmínticas de los octadepsipéptidos cíclicos

5 Se alojan ratones macho (cepa Bor CFW, peso corporal entre 25 y 30 g) en jaulas de Makrolon (3 animales/jaula) y se abastecen *ad libitum* con agua y pienso de rata SNIFF (gránulos de 10 mm). Los ratones se infectan con *Heterakis spumosa* mediante la aplicación oral de 90 huevos embrionados. Los huevos se obtuvieron de gusanos hembra, que se aislaron del colon de los ratones 40 días después de la infección. Los huevos se incubaron durante 3 semanas adicionales a 37 °C. 35 días después de la infección, los ratones se tratan con la dosis correspondiente de PF1022A o emodépsido en cuatro días sucesivos. El PF1022A se suspende en Cremophor EL. Los ratones se sacrifican el día 7 después del tratamiento, se retira la zona de intestino delgado/ciego/colon y los gusanos se cuentan macroscópicamente. La proporción del número de los gusanos expulsados en porcentaje con respecto al número total de los gusanos en animales de control infectados no tratados se define como medida para la eficacia antihelmíntica.

Los experimentos en gallina se describen en (14) y en la bibliografía citada en ese documento.

### 15 Tabla 9: actividad antihelmíntica de PF1022A y emodépsido contra nematodos de la superfamilia de los Heterakoidea

Nematodo	Dosificación con eficacia completa
PF1022A	
<i>Heterakis spumosa</i> (ratón)	50 mg/kg
<i>Ascaridia galli</i> (gallina)	2 mg/kg
emodépsido	
<i>Heterakis spumosa</i> (ratón)	1-10 mg/kg

**REIVINDICACIONES**

1. El uso de nifurtimox para la fabricación de fármacos para el tratamiento de enfermedades causadas por Trichomonadida.
- 5 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 para el tratamiento de enfermedades causadas por histomonas.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2 para el tratamiento de enfermedades causadas por *Histomonas meleagridis*.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 para el tratamiento de enfermedades causadas por tricomonas.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 para el tratamiento de enfermedades causadas por tritricomonas.
- 10 6. Nifurtimox para el uso para el tratamiento de las enfermedades causadas por Trichomonadida.
7. Nifurtimox para el uso de acuerdo con la reivindicación 6 para el tratamiento de enfermedades causadas por histomonas.
8. Nifurtimox para el uso de acuerdo con la reivindicación 7 para el tratamiento de enfermedades causadas por *Histomonas meleagridis*.
- 15 9. Nifurtimox para el uso de acuerdo con la reivindicación 6 para el tratamiento de enfermedades causadas por tricomonas.
10. Nifurtimox para el uso de acuerdo con la reivindicación 6 para el tratamiento de enfermedades causadas por tritricomonas.
11. Nifurtimox para el uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 10 en aves de corral.
- 20 12. Nifurtimox para el uso de acuerdo con la reivindicación 11 en pavos.