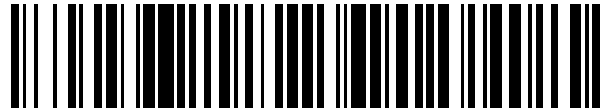


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 581**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/541** (2006.01)

**A61K 38/15** (2006.01)

**A61P 33/02** (2006.01)

**A61K 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2009 E 09772099 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 2310018**

54 Título: **Uso de nifurtimox para el tratamiento de giardiasis**

30 Prioridad:

**02.07.2008 DE 102008031284**

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

**25.02.2014**

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH  
(100.0%)**

**Alfred-Nobel-Strasse 10  
40789 Monheim , DE**

72 Inventor/es:

**GREIF, GISELA;  
HARDER, ACHIM;  
BACH, THOMAS;  
PETRY, GABRIELE y  
KRUEDEWAGEN, EVA-MARIA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 444 581 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 de nifurtimox para el tratamiento de giardiasis

La presente invención se refiere al uso de nifurtimox para el tratamiento de giardiasis, en particular en perros y gatos.

5 La actividad de compuestos nitroheterocíclicos contra enfermedades por protozoos es conocida (1).

Los protozoos incluyen organismos mononucleares cuya estructura básica es una célula eucariota. En la sistemática estricta existen sin embargo grandes diferencias en el modo de vida, la morfología y el metabolismo bioquímico de los diferentes filos, clases, géneros y especies. Por ello, las sustancias químicas, dependiendo de su punto de ataque y su mecanismo de acción, no actúan, generalmente, de forma similar contra todos los protozoos, sino sólo  
10 contra grupos especiales de protozoos (2, 3, 4).

Hasta la fecha sólo se ha descrito la actividad del nifurtimox contra especies de protozoos del género *Trypanosoma*, por ejemplo *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* (5). Los tripanosomas poseen un flagelo, que surge del cuerpo basal ("cinetosoma") y que conforma junto con el cuerpo base una membrana ondulante. Los parásitos con este tipo básico morfológico pertenecen al orden de los cinetoplastidos en la sistemática de protozoos. Los tripanosomas se reproducen principalmente en el plasma sanguíneo y se transmiten por artrópodos chupadores de sangre. Estos organismos patógenos causan la enfermedad de Chagas ("tripanosomiasis") en los seres humanos. El nifurtimox es actualmente casi el único compuesto que actúa contra este organismo patógeno. Esta actividad se basa probablemente en la inhibición de la tripanotión reductasa, una enzima especial de los tripanosomas. Esta enzima está ausente en otros protozoos patógenos.

20 En una solicitud de patente en trámite paralelo, describimos la actividad del nifurtimox contra los tricomonádidos.

Respecto a la giardiasis, se trata de una enfermedad infecciosa causada por parásitos unicelulares flagelados del género *Giardia*. Este género pertenece al orden de los diplomonádidos. Un representante importante es *Giardia lamblia* (sin. *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis*). En el mundo hasta un 50 % de muestras tomadas a perros y gatos dan positivas, en Centroeuropa del 2 al 7 %. Una infección causa, en particular en los animales muy jóvenes de hasta medio año de vida, diarreas prolongadas, y es la causante de deposiciones parcialmente sanguinolientas debidas a la inflamación del duodeno y el yeyuno. Las enfermedades crónicas pueden provocar retrasos prolongados en el crecimiento (6).

Se han descrito más de 7 genotipos (A-G) para aislados de giardias. Para los seres humanos son infecciosos los genotipos A + B, que a su vez también pueden estar presentes en gatos, perros, castores, ovejas, terneros, caballos, cerdos y monos. Por ello, la enfermedad se considera como una "zoonosis": Los seres humanos pueden contagiarse por agua potable contaminada con cisteína procedente de perros y gatos. Las infecciones por giardias se incluyen mundialmente entre las causantes más frecuentes de los denominados "brotes epidémicos de transmisión hídrica" en los seres humanos (7).

La infección tiene lugar la mayor parte de las veces por vía oral, por agua potable contaminada o por heces infecciosas, en forma de quiste. En el intestino salen del quiste los denominados trofozoitos. Un trofozoito mide 11-17 x 7-11 µm, tiene dos núcleos y 8 flagelos. A diferencia de otros grupos de parásitos flagelados, los trofozoitos de giardias no penetran intracelularmente en epitelios. Los trofozoitos disponen de una ventosa y usando la misma se anclan en el lumen intestinal de seres humanos, monos, cerdos, perros y gatos, en su lado exterior. Allí se reproducen mediante fisión binaria. Un ataque masivo bloquea y modifica la superficie absorbente del intestino y causa diarreas parcialmente sanguinolientas. En el intestino ciego se forman de nuevo quistes, que con una prepatencia de 5 a 16 días después de la primera infección se excretan de nuevo a través de los excrementos. Los quistes pueden excretarse durante un periodo de 4 a 5 semanas y se mantienen infecciosos durante varias semanas (8, 9).

Morfológica y bioquímicamente existen grandes diferencias respecto al orden de los cinetoplastidos: los diplomonádidos poseen 8 flagelos y dos núcleos, pero no tienen ni mitocondrias ni complejo de Golgi y dentro de su desarrollo no se conoce ningún estadio intracelular. A diferencia de los tripanosomas, las proteínas de superficie de las giardias no poseen ancla GPI (10).

Para perros y gatos se recomienda actualmente una terapia con metronidazol (Clont®, Flagyl®, Elyzol®) con una dosis de 12,5-22 mg/kg de peso corporal, 2 veces al día durante 5 días. (11). El metronidazol y otros 5-nitroimidazoles se activan mediante la enzima piruvato-ferredoxin-oxidoreductasa, formando radicales nitro libres que después atacan al metabolismo de ADN del parásito. Por ello, son también adecuados para la terapia contra la giardiasis en perros los iprinidazoles (Ipropan®, 126 mg/l de agua potable durante 7 días) y el tinidazol (Fasigyn® 44 mg/kg de peso corporal durante 3 días) (12,13).

Del grupo de los bencimidazoles se recomiendan mebendazol, albendazol o fenbendazol (vía oral durante 3 días). Los bencimidazoles interfieren con la polimerización de los microtúbulos, uniéndose a la subunidad de la β-tubulina. Los microtúbulos son elementos importantes del citoesqueleto de los parásitos, que estabilizan de un modo

particular el disco adhesivo de los trofozoitos.

En seres humanos se usan también antibióticos (por ejemplo paramomicina, 25-35 mg/kg/día en tres dosis durante 7- 10 días), quinacrina y furazolidona (100 mg tres veces al día durante 7 días) o nitazoxanida (500 mg dos veces al día durante 3 días) (14).

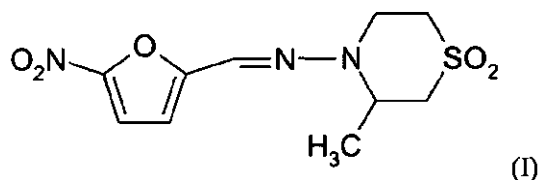
- 5 Muchas de estas clases de principios activos se usan desde hace tiempo para el tratamiento de enfermedad por giardias y para la mayor parte pudo demostrarse el desarrollo de resistencia, lo que ha llevado a fracasos terapéuticos documentados. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos principios activos y conceptos de tratamiento es absolutamente necesario (15).

- 10 Sorprendentemente, ahora hemos descubierto la actividad del nifurtimox contra giardias. Esta actividad no se ha descrito hasta ahora. La actividad se dirige contra estadios de microorganismos patógenos del intestino y previene la formación de quistes.

Por lo tanto, la invención se refiere por consiguiente:

al uso de nifurtimox para la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades causadas por giardias.

- 15 El nifurtimox es el compuesto de la fórmula (I):



Dado el caso también se considera el uso en forma de sales habituales farmacéuticamente aceptables. Además, también se considera, dado el caso, el uso de hidratos o de otros solvatos de los principios activos o, dado el caso, de sus sales.

- 20 La aplicación puede realizarse tanto profiláctica como también terapéuticamente. La actividad se dirige contra diferentes estadios de microorganismos patógenos; el nifurtimox actúa en particular contra los estadios de microorganismos patógenos del intestino y previene la formación de quistes.

Entre las giardias tienen una importancia particular *Giardia lamblia* (sin. *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis*), *Giardia bovis* y *Giardia caprae*. Las especies indicadas en el presente documento se mencionan frecuentemente como sinónimos entre ellas y son poco específicas del huésped.

- 25 Según la invención, se tratan animales (carnívoros y animales silvestres), preferentemente mamíferos, como por ejemplo caballos, cerdos, conejos, en particular perros o gatos.

Entre los mamíferos es preferente, según una forma de realización, el tratamiento de animales silvestres y en particular de carnívoros (perros, gatos).

- 30 También se considera a los seres humanos para un tratamiento, ya que pueden infectarse por agua potable contaminada con las especies de giardias patógenas de animales.

La giardiasis aparece sobre todo en animales jóvenes, preferentemente en edades de 3 a 10 semanas y causa diarreas graves y una disminución del aumento de peso.

La aplicación de los principios activos se realiza directamente o en forma de preparaciones adecuadas mediante aplicación enteral, parenteral o dérmica.

- 35 La aplicación enteral de los principios activos se realiza, por ejemplo, por vía oral en forma de polvos, supositorios, comprimidos, cápsulas, pastas, pociones, gránulos, brebajes, bolos, alimentos medicados o agua potable medicada. La aplicación dérmica se realiza, por ejemplo, en forma de inmersión (sumersión), pulverización (aerosol), baño, lavado, vertido (en el dorso ("pour on") y en la cruz ("spot-on")) y espolvoreo. La aplicación parenteral se realiza, por ejemplo, en forma de inyección (intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal) o mediante implantes.

- 40 Son preparaciones adecuadas:

Soluciones tales como soluciones para inyección, soluciones orales, concentrados para administración oral tras dilución, soluciones para uso sobre la piel o en las cavidades corporales, formulaciones para verter, geles;

Emulsiones y suspensiones para administración oral o dérmica, tales como inyección, preparaciones semisólidas;

Formulaciones en las que el principio activo se administra en una base de pomada o en una base de emulsión de aceite en agua o de agua en aceite;

- 5 Preparaciones sólidas tales como polvos, premezclas o concentrados, gránulos, pellas, comprimidos, bolos, cápsulas, aerosoles e inhalados, cuerpos moldeados que contienen el principio activo.

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

Las soluciones orales se administran directamente. Los concentrados se administran oralmente después de una dilución previa a la concentración de administración.

- 10 Las soluciones para aplicar sobre la piel se aplican mediante goteo, unción, frotando, salpicando, pulverizando o se aplican por inmersión (sumersión), baño o lavado.

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

Las formulaciones para verter se vierten o se rocían sobre zonas limitadas de la piel; la sustancia activa bien penetra la piel y actúa sistemáticamente o bien se distribuye sobre la superficie corporal.

- 15 Las emulsiones son bien del tipo de agua en aceite o bien del tipo de aceite en agua y pueden administrarse oralmente, dérmicamente o como inyecciones.

Las suspensiones se pueden administrar oralmente, dérmicamente o como inyecciones.

Las preparaciones semisólidas pueden administrarse oralmente o dérmicamente. Sólo se diferencian de las suspensiones y emulsiones descritas anteriormente por tener una viscosidad más elevada.

- 20 Para la preparación de preparaciones sólidas se mezclan los principios activos con los vehículos adecuados añadiendo, dado el caso, coadyuvantes, y se aplican en la forma deseada.

La administración oral es particularmente preferente según la invención, siendo los comprimidos particularmente preferentes de entre las formas habituales de administración oral.

- 25 Todas las formas farmacéuticas mencionadas anteriormente, los aditivos y coadyuvantes que hay que usar y la preparación de estas formas farmacéuticas son conocidas, en principio, por los expertos.

Los principios activos pueden estar presentes en combinación con sinérgicos o con otros principios activos. Pueden mencionarse como principios activos adicionales:

- 30 Agentes contra la coccidiosis tales como robenidina o amprolium en combinación, en parte, con antagonistas de ácido fólico (por ejemplo pirimetamina, epiroprim, trimetoprim); antibióticos tales como por ejemplo clindamicina, paramomicina o espiramicina; sulfamidas tales como por ejemplo sulfadimetoxina, sulfadimidina, sulfadiazina; antihelmínticos tales como por ejemplo depsipéptidos cíclicos (por ejemplo emodépsido, PF1022A), derivados de amidina (tribendimidina, amidantel, Bay d 9216), praziquantel o benzoato de bencilo.

Para un efecto en el tratamiento a largo plazo es recomendable desinfectar regularmente los lugares de tenencia de los animales.

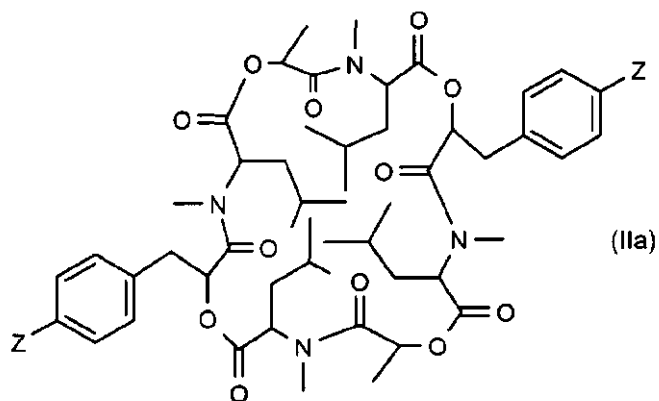
- 35 Los antihelmínticos, en particular los octadepsipéptidos cíclicos tales como PF1022A o emodépsido son adecuados para la lucha contra las infecciones causadas por nematodos en seres humanos y animales (16). A este respecto, se destruyen todos los nematodos con importancia económica en el conducto gastrointestinal, entre otros, también en perros. También se sabe que en caso de no tratamiento de los animales, la respuesta inmunitaria del GALT (= tejido linfoide asociado al aparato intestinal) está dirigida contra los gusanos (17). Se habla, a este respecto, de una respuesta Th2 del sistema inmunitario. Normalmente, en caso de no infección, la respuesta inmunitaria está equilibrada, es decir, el oponente de la respuesta Th2, es decir la respuesta Th1, que está dirigida contra protozoos, virus y bacterias, es tan alta como la respuesta Th2.

- 45 Si en el animal de referencia, por ejemplo en el perro, existe infección por nematodos, por ejemplo infección por anquilostomas, ascárides o tricocéfalos, el equilibrio se altera, lo que conduce, de forma exagerada, a una infección por protozoos en el intestino, causada, por ejemplo, por giardias. Si se cura ahora la infección por nematodos usando el antihelmíntico adecuado, se potencia indirectamente la defensa contra giardias, lo que provoca que la respuesta Th1 contra estos protozoos cobre importancia. En la combinación de nifurtimox con antihelmíntico, el nifurtimox puede entonces combatir la infección por giardias más fácilmente, ya que ésta, parcialmente, se mantiene dentro de los límites por la respuesta Th1, aumentada indirectamente por la lucha contra los nematodos, es decir, el número de parásitos en el intestino ya ha disminuido.

Según una forma de realización preferente, el nifurtimox se usa en combinación con antihelmínticos.

Los antihelmínticos que se usan con preferencia son ciclodepsipéptidos (ciclooctadepsipéptidos). Se pueden mencionar como tales:

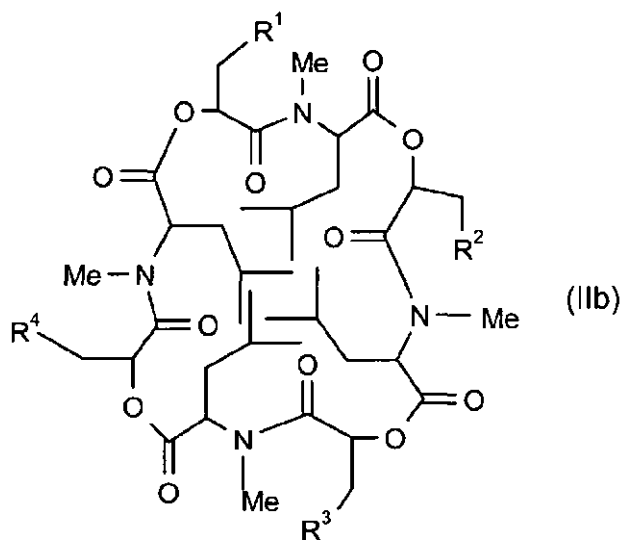
Compuestos de la fórmula (IIa)



5 en la que

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

Además, se pueden mencionar compuestos de la fórmula (IIb) siguiente:

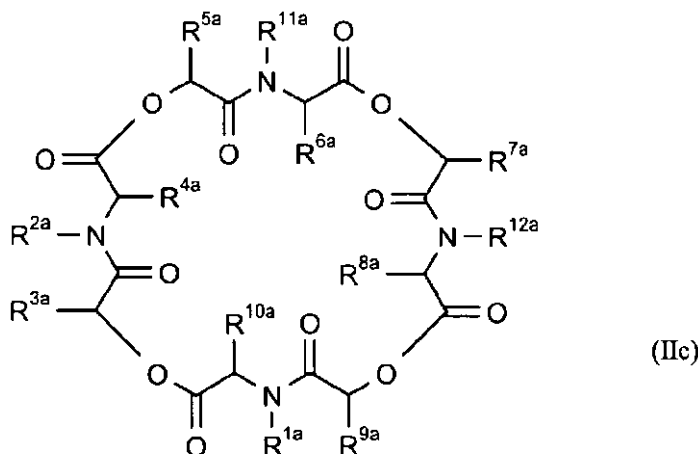


en la que

10 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, independientemente unos de otros, representan hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> o arilo, en particular fenilo, que dado el caso están sustituidos con hidroxilo, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> o halógeno.

Los compuestos de la fórmula general (IIb) son conocidos y pueden obtenerse según 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.

15 Entre los depsipéptidos cíclicos con 24 átomos anulares se encuentran también compuestos de la fórmula general (IIc)



en la que

$R^{1a}$ ,  $R^{2a}$ ,  $R^{11a}$  y  $R^{12a}$ , independientemente unos de otros, representan alquilo  $C_1-C_8$ , halogenoalquilo  $C_1-C_8$ , cicloalquilo  $C_3-C_6$ , aralquilo, arilo,

5  $R^{3a}$ ,  $R^{5a}$ ,  $R^{7a}$ ,  $R^{9a}$ , independientemente unos de otros, representan hidrógeno o alquilo  $C_1-C_8$  de cadena lineal o ramificado, que dado el caso puede estar sustituido con hidroxilo, alcoxi  $C_1-C_4$ , carboxi,  $-C(=O)-OH$ , carboxamida,  $-O-C(=O)-NH_2$ , imidazolilo, indolilo, guanidino,  $-SH$  o alquil  $C_1-C_4$ -tio y además representan arilo o aralquilo, que pueden estar sustituidos con halógeno, hidroxilo, alquilo  $C_1-C_4$ , alcoxi  $C_1-C_4$ ,

10  $R^{4a}$ ,  $R^{6a}$ ,  $R^{8a}$ ,  $R^{10a}$ , independientemente unos de otros, representan hidrógeno, alquilo  $C_1-C_5$  de cadena lineal, alqueno  $C_2-C_6$ , cicloalquilo  $C_3-C_7$ , que dado el caso pueden estar sustituidos con hidroxilo, alcoxi  $C_1-C_4$ , carboxi, carboxamida, imidazolilo, indolilo, guanidino,  $SH$  o alquil  $C_1-C_4$ -tio, así como arilo o aralquilo que pueden estar sustituidos con halógeno, hidroxilo, alquilo  $C_1-C_4$ , alcoxi  $C_1-C_4$ , así como sus isómeros ópticos y racematos.

Son compuestos preferentes de la fórmula (IIc) aquellos en los que

15  $R^{1a}$ ,  $R^{2a}$ ,  $R^{11a}$  y  $R^{12a}$ , independientemente unos de otros, representan metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-, s-, t-butilo o fenilo, que dado el caso está sustituido con halógeno, alquilo  $C_1-C_4$ ,  $OH$ , alcoxi  $C_1-C_4$ , así como representan bencilo o feniletilo, que dado el caso pueden estar sustituidos con los restos indicados para el fenilo;

$R^{3a}$  a  $R^{10a}$  tienen el significado indicado anteriormente.

Son compuestos particularmente preferentes de la fórmula (IIc) aquellos en los que

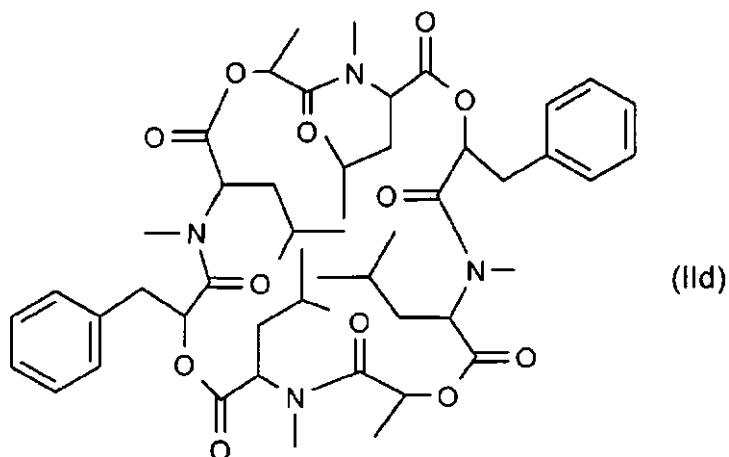
$R^{1a}$ ,  $R^{2a}$ ,  $R^{11a}$  y  $R^{12a}$ , independientemente unos de otros, representan metilo, etilo propilo, isopropilo o n-, s-, t-butilo,

20  $R^{3a}$ ,  $R^{5a}$ ,  $R^{7a}$ ,  $R^{9a}$  representan hidrógeno, alquilo  $C_1-C_8$  de cadena lineal o ramificado, en particular metilo, etilo, propilo, i-propilo, n-, s-, t-butilo, que dado el caso pueden estar sustituidos con alcoxi  $C_1-C_4$ , en particular metoxi, etoxi, imidazolilo, indolilo o alquil  $C_1-C_4$ -tio, en particular metiltio, etiltio, además representan fenilo, bencilo o feniletilo, que dado el caso pueden estar sustituidos con halógeno, en particular con cloro.

25  $R^{4a}$ ,  $R^{6a}$ ,  $R^{8a}$ ,  $R^{10a}$ , independientemente unos de otros, representan hidrógeno, metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, vinilo, ciclohexilo, que dado el caso pueden estar sustituidos con metoxi, etoxi, imidazolilo, indolilo, metiltio, etiltio, así como representan isopropilo, s-butilo, y representan además fenilo, bencilo o feniletilo dado el caso sustituidos con halógeno.

30 Los compuestos de la fórmula (IIc) pueden obtenerse también según 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 depsipéptido muy particularmente preferente se tiene el compuesto PF 1022, conocido por el documento EP-OS 382 173; se trata de un compuesto de la fórmula (IIa) en la que ambos sustituyentes Z representan hidrógeno. Por lo tanto, el PF 1022 tiene la fórmula (IIb) siguiente:

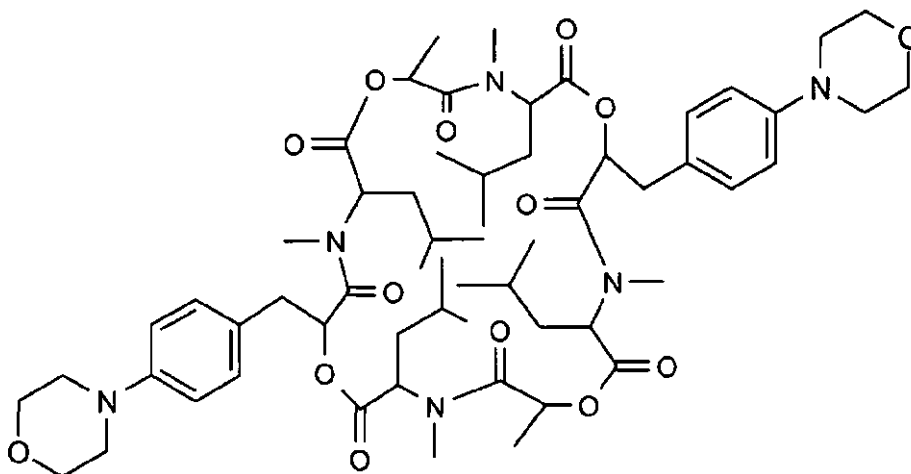


Otros depsipéptidos preferidos son compuestos conocidos por la solicitud PCT WO 93/19053 y, concretamente, compuestos de la fórmula (IIa),

en la que

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

- 5 De entre estos compuestos es muy particularmente preferente el depsipéptido emodépsido (PF 1022-221). Se trata de un compuesto de la fórmula (IIa) en la que ambos restos Z representan el resto morfolinilo. La DCI emodépsido la 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*-morfolino-fenil)lactoil-*N*-metil-L-leucilo. El emodépsido se describe en el documento WO 93/19053 y tiene la fórmula siguiente:



- 10 Los principios activos adecuados para combinación mencionados anteriormente pueden, dependiendo de su estructura, estar presentes en formas estereoisómeras o como mezclas de estereoisómeros, por ejemplo como enantiómeros o racematos. Tanto las mezclas de estereoisómeros como también los estereoisómeros puros pueden usarse según la invención.

- 15 Además, dado el caso, pueden usarse: sales de principios activos con ácidos o bases farmacéuticamente aceptables y también solvatos, en particular hidratos, de los principios activos o de sus sales.

La aplicación en combinación significa que el nifurtimox y el segundo principio activo, en particular un ciclodepsipéptido, pueden aplicarse bien por separado o bien de forma temporalmente escalonada. En este caso el nifurtimox y el segundo principio activo se formulan en cada caso como medicamentos separados.

- 20 También es posible una aplicación simultánea. Según una forma de realización adecuada para este caso, los principios activos de la combinación se formulan conjuntamente en un agente.

Las preparaciones listas para su uso contienen el principio activo correspondiente, habitualmente, en concentraciones de 10 ppm al 20 % en peso, preferentemente del 0,1 al 10 % en peso.

- 5 Las preparaciones que se diluyen antes de la aplicación contienen el principio activo correspondiente en concentraciones del 0,5 al 90 % en peso, preferentemente del 5 al 50 % en peso. En soluciones concentradas para dosificar en agua potable, el principio activo correspondiente está presente, por ejemplo, en concentraciones del 0,5 al 20 % en peso, preferentemente del 1 al 15 % en peso, de modo particularmente preferente del 2 al 10 % en peso.

En general, se ha demostrado que es ventajoso administrar cantidades de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 400 mg, preferentemente de 0,1 a 200 mg, de principio activo por kg de peso corporal por día para obtener resultados eficaces.

- 10 En la mezcla con otros agentes contra la coccidiosis, antibióticos o antihelmínticos, los principios activos según la invención están presentes en una relación de 1 a 0,01-50 hasta 1 a 1-50.

Los principios activos también pueden administrarse junto con el pienso o el agua potable de los animales.

Los alimentos y el pienso contienen de 0,005 a 1.000 ppm, preferentemente de 0,05 a 500 ppm, de principio activo en combinación con un material comestible adecuado.

- 15 Dichos alimentos y piensos pueden usarse tanto con fines curativos como también con fines profilácticos.

- 20 Como complemento del tratamiento con nifurtimox puede usarse un agente desinfectante. Con el agente desinfectante se desinfectan los sitios de alojamiento de los animales (o de los seres humanos) durante el tratamiento. El agente desinfectante se encarga preferentemente de la destrucción de las formas de quiste excretadas para una eliminación de los estadios parasitarios de larga duración e impide, con ello, una reinfección después de finalizar el tratamiento. Por lo tanto, el desinfectante puede usarse ya antes del tratamiento con nifurtimox, pero es mejor, por regla general, usarlo simultáneamente al tratamiento con nifurtimox o al menos antes de finalizarlo.

- 25 Los desinfectantes son, por ejemplo, los basados en fenoles biocidas y/o derivados de fenol. Por fenoles biocidas se entiende los compuestos de fenol que portan un grupo OH libre y que presentan una actividad biocida. Estos fenoles pueden portar otros sustituyentes anulares como, por ejemplo, halógenos, en particular cloro, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo, clorofenilo, bencilo y/o clorofenilo.

- 30 Fenoles biocidas no clorados son, por ejemplo: 2-metilfenol, 3-metilfenol, 4-metilfenol, 4-etilfenol, 2,4-dimetilfenol, 2,5-dimetilfenol, 3,4-dimetilfenol, 2,6-dimetilfenol, 4-n-propilfenol, 4-n-butilfenol, 4-n-amilfenol, 4-n-hexilfenol, timol (5-metil-2-isopropilfenol), 2-fenilfenol, 4-fenilfenol, 2-bencilfenol. Preferentemente, como fenol biocida no clorado se usa 2-fenilfenol.

- 35 Fenoles biocidas clorados son, por ejemplo, 4-cloro-3-metilfenol (PCMC, p-cloro-m-cresol), 4-cloro-3-etilfenol, 2-n-amil-4-clorofenol, 2-n-hexil-4-clorofenol, 2-ciclohexil-4-clorofenol, 4-cloro-3,5-xilenol (PCMX, p-cloro-m-xilenol), 2,4-dicloro-3,5-xilenol (DCMX, dicloro-p-xilenol), 4-cloro-2-fenilfenol, 2-bencil-4-clorofenol, bencil-4-cloro-m-cresol, 4-clorobencil-dicloro-m-cresol. Fenoles biocidas clorados preferentes son 2-bencil-4-clorofenol, 4-cloro-3,5-xilenol, 2,4-dicloro-3,5-xilenol y, en particular, 4-cloro-3-metilfenol.

Por derivados de fenol se entiende en el presente documento los compuestos derivados de fenol cuyo grupo OH está derivatizado, de modo que no contienen ningún grupo OH libre. Son preferentes los éteres fenólicos, en particular con alcoholes alifáticos con 1 a 6 átomos de carbono. Como ejemplo preferente se puede mencionar el fenoxietanol.

- 40 Se usan preferentemente los desinfectantes descritos en el documento WO 2007/009606, que contienen biocidas y un compuesto queratolítico. En el documento WO 2007/009606 se describen con detalle biocidas o combinaciones de biocidas y compuestos queratolíticos adecuados, que se indican expresamente en este documento.

## **Ejemplos**

### **Ejemplos de formulación**

- 45 Ejemplo 1 (formulación líquida):

Suspensiones en 100 ml de glicerinformal/glicerina-ricinoleato de polietilenglicol (Cremophor® EL)/agua en una relación de mezcla de 1 : 10 con:

- 500 mg de nifurtimox
- 1.000 mg de nifurtimox



Ejemplo 2 (formulación líquida):

Suspensiones en 100 ml de Cremophor® EL/agua en una relación de mezcla de 1 : 5 con:

- 500 mg de nifurtimox
- 1.000 mg de nifurtimox

5 Ejemplo 3 (formulación sólida)

Se llena una cápsula de gelatina con los principios activos en forma de polvo en las cantidades que se indican a continuación:

- 250 mg de nifurtimox

Ejemplo 4 (comprimido)

10 Los comprimidos de nifurtimox son conocidos y pueden obtenerse como medicamento, por ejemplo, con la denominación comercial Lampit®.

**Ejemplos biológicos**

**Ejemplo 1**

15 Cachorros Beagle de 10-11 semanas de edad, que antes de la infección pudieron aclimatarse al centro de animales durante 11 días, se infectaron por vía oral con 50.000 quistes de Giardia duodenalis. Los quistes para la infección se obtuvieron de excrementos de perros con quistes de giardias usando un gradiente de sacarosa y se almacenaron en medio de bacto-casitona durante no más de 2 semanas a 4 grados Celsius. A partir del día 10 después de la infección, los cachorros se mantuvieron en jaulas individuales para recoger los excrementos totales diarios individualmente. La determinación cuantitativa de la excreción de quistes se realizó en los 4 días anteriores al tratamiento (día -3 a 0) y los cachorros se distribuyeron en dos grupos aleatoriamente mediante sus excreciones de quistes. El día 0 se realizó el tratamiento de 7 cachorros del grupo de tratamiento con una toma oral única de 50 mg/kg de nifurtimox (Lampit®), mientras que los 6 perros del grupo de control se mantuvieron sin tratamiento. Del día 1 al día 8 después del tratamiento, se determinó de nuevo cuantitativamente la excreción de quistes.

Resultados: La actividad se calculó con la fórmula siguiente:

25

La actividad calculada para una única toma de nifurtimox fue del 90,4 % (véase la tabla 1).

30 Procedimiento: La determinación cuantitativa de la excreción de quistes se realizó según una versión modificada de Hewlett (18): Se disolvieron 4 g de excrementos en 100 ml de agua, se filtraron y se dejaron sedimentar. El sedimento se estratificó en un gradiente de sacarosa 1 M (peso específico 1,13) y los quistes, que se enriquecieron tras centrifugación en la capa de separación de sacarosa-agua, se extrajeron con pipeta. Tras una etapa de lavado con centrifugación posterior, se contaron los quistes en el sedimento. Para ello, se hizo un recuento de una parte alicuota del sedimento al microscopio y se calculó la cantidad de quistes por g de excremento.

$\text{Actividad (\%)} = \frac{\text{Número de quistes del grupo de control} - \text{Número de quistes del grupo de tratamiento}}{\text{Número de quistes del grupo de control}} \times 100$
--

Tabla 1: Excreción de quistes de giardias antes y después del tratamiento con nifurtimox

50 mg/kg de nifurtimox el día D 0												
Perro	D -3	D -2	D -1	D 0	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7	D 8
9048	22402	186750	189275	19681	0	0	0	424	0	0	191	1621
9028	5259	45672	45725	16419	2636	180	224	1451	1318	4102	4615	1768
8343	5339	28322	26163	13644	2391	0	0	193	153	6315	223	508
8329	29625	907	1306	4397	504	0	0	590	1700	3693	8881	3294
9040	1063	923	14238	8456	4928	0	0	0	1094	2000	431	517
9038	1385	5897	2264	0	152	0	0	0	0	1201	1873	14181
9020	3263	905	788	375	0	0	0	652	137	353	608	0
Σ	9762	38482	39966	8996	1516	26	32	473	629	2523	2403	3127
Controles infectados no tratados												
Perro	D -3	D -2	D -1	D 0	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7	D 8
9008	65325	41925	368	0	450	179	1183	3288	4747	14232	22237	3684
8341	21150	44988	35525	3138	1332	806	23399	17739	27253	9321	2660	12901
8309	7144	34613	33688	4531	25050	13238	5547	26106	52000	5125	47365	47999
8327	21250	21485	1350	3991	5383	4520	3529	17355	6145	14298	25331	110846
8313	2975	3185	8168	1209	609	6133	8438	6739	18113	4027	7103	2645
9026	945	2813	1723	2038	3544	3366	20163	11291	6719	4621	5867	5621
Σ	19798	24835	13470	2485	6061	4707	10377	13753	19163	8604	184427	30616
D -3 a D -1: Días antes del tratamiento												
D 0: Día del tratamiento												
D 1 a D 8: Días después del tratamiento												

Tratamiento	Σ Excreción de quistes de giardias		Actividad
	Día -3 a 0	Día 1 a 8	
50 mg/kg de nifurtimox	24302	1341	90,4 %
Controles infectados no tratados	15147	13963	

### **Ejemplo 2**

5 Cachorros Beagle de 11-15 semanas de edad, que antes de la infección pudieron aclimatarse al centro de animales durante dos semanas, se infectaron por vía oral, antes del comienzo del estudio, con 50.000 quistes de *Giardia duodenalis*. Los quistes para la infección se obtuvieron de excrementos de perros con quistes de giardias usando un gradiente de sacarosa y se almacenaron en medio de bacto-casitona durante no más de 2 semanas a 4 grados Celsius. Se incluyeron en el estudio 18 cachorros que excretaban quistes de giardias y se mantuvieron en jaulas individuales, para recoger el excremento diario total. La determinación cuantitativa de la excreción de quistes se realizó como en el ensayo 145.717, con la modificación de que la parte alícuota del sedimento se contó usando la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal bajo el microscopio. La determinación cuantitativa de la excreción de quistes se realizó durante 4 días antes del tratamiento (día -3 a 0) y los cachorros se distribuyeron en tres grupos aleatoriamente mediante sus excreciones de quistes. En tres días sucesivos siguientes (día 0, 1 y 2) se realizó el tratamiento de los seis cachorros del grupo de tratamiento 1 por la mañana con una toma oral de 50 mg/kg de nifurtimox (Lampit®), mientras que los 6 perros del grupo de tratamiento 2 se trataron en estos tres días por la mañana con una toma oral de 50 mg/kg de fenbendazol (comprimidos de fenbendazol). Los 6 perros del grupo de control se mantuvieron sin tratamiento. Del día 1 al día 8 después del tratamiento se determinó cuantitativamente de nuevo la excreción de quistes.

15 Resultados: La actividad calculada de nifurtimox fue del 98,6 %, mientras que la actividad del fenbendazol fue del 48,3 % (véase la tabla 2).

20

Tabla 2: Excreción de quistes de giardias antes y después del tratamiento con nifurtimox en comparación con el tratamiento con fenbendazol.

50 mg/kg de nifurtimox en los días D 0, D 1 y D 2												
Perro	D -3	D -2	D -1	D 0	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7	D 8
9300	63463	79689	91293	103442	1261	527	0	0	0	0	0	903
0136	102900	68914	59273	112084	2000	0	0	622	1299	93	0	0
0116	57571	10685	25515	60420	809	741	0	0	229	0	0	517
8553	40909	8278	3472	675	187	0	0	185	0	98	0	0
8531	4891	1618	37203	89880	974	0	0	0	0	0	87	975
0134	28773	133	8528	86	0	0	0	0	2299	1842	237	0
Σ	49751	28220	37547	61098	872	211	0	135	638	339	54	399
50 mg/kg de fenbendazol en los días D0, D1 y D2												
Perro	D -3	D -2	D -1	D 0	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7	D 8
0117	18781	47754	243143	49400	67200	0	67109	49423	3116	4635	17474	0
9320	60193	23808	56014	28559	14596	5980	7043	652	18725	7546	20780	5555
8555	44218	26526	2349	639	872	0	961	439	4432	5594	260	5968
8543	34119	18113	16328	2719	12488	3386	3075	12038	0	3691	18056	10875
0135	20463	7230	14744	17037	6178	490	0	0	0	0	251	0
9328	2003	10109	21360	23290	723	552	5388	14133	19057	11495	20657	6370
Σ	29963	22257	58990	20274	17010	1735	13929	12781	7555	5494	12913	4795
<b>Controles infectados no tratados</b>												

(continuación)

Perro	D -3	D -2	D -1	D 0	D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7	D 8
0121	112757	27324	121092	108868	153336	64620	6127	190	6879	85408	73978	50256
0138	22125	65547	60200	26964	22234	855	17893	8138	13204	3681	439	1470
9332	22346	34475	42076	24466	24360	19145	12575	1455	5712	16122	21440	12563
8529	8884	49213	12881	32105	71378	1139	6409	4739	5297	23725	11626	2835
9330	18829	4711	22120	2476	1987	0	246	2492	4472	602	2052	813
0137	4623	12238	14406	14328	2134	10156	16756	0	8170	104020	79097	55935
Σ	31594	32251	45463	34868	45905	15986	10001	2836	7289	38926	31439	20645
D -3 a D -1:	Días antes del tratamiento											
D 0, D 1, D 2:	Días del tratamiento											
D 3 a D 8:	Días después del tratamiento											

Tratamiento	Σ Excreción de quistes de giardias		Actividad
	Día -3 a 0	Día 3 a 8	
50 mg/kg de nifurtimox	44154	261	98,6 %
50 mg/kg de fenbendazol	32871	9578	48,3 %
Controles infectados no tratados	36044	18523	

### Bibliografía

- (1) Raether w., Hanel H. (2003): Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity Parasitol Res. 90: página 19- página 39.
- 5 (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.
- (6) Adam R.D. (2001): Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Reviews, julio: 447-475.
- 15 (7) Marshall MM, Naumovitz D., Ortega Y., Sterling CR. (1997): Waterborne Protozoan Pathogens. Clinical Microbiology Reviews, enero:67-85.
- (8) Roxstrom-Lindquist, K. Palm D., Reiner D., Ringqvist E., Svard SG. (2006): Giardia immunity - an update. Trends in Parasitology Vo. 22(1):26-31.
- (9) Beckmann L. (2003): Mucosal defences against Giardia. Parasite Immunology 25:259-270.
- 20 (10) Hülsmeier A. J., Kohler P. (2005): Giardia duodenalis: direct experimental evidence for the absence of a glycosylphosphatidylinositol anchor in a variant surface protein. Experimental Parasitology 109:49-52.
- (11) Kirkpatrick, CE, Farrell JP (1984): Feline giardiasis: observations on natural and induced infections. Amer. J. Vet. Res. 45:2182-2188.
- (12) Zimmer JF, Burrington DB (1986): Comparison of four protocols for the treatment of canine giardiasis. J. Amer. Anim. Hosp. Ass. 22:168-172.
- 25 (13) Abbitt B, Huey RL, Eugster AK, Syler J. (1986): Treatment of giardiasis in adult greyhounds, using ipronidazole-medicated water. J. Amer. Vet. Med. Ass. 188:67-69.
- (14) Wright JM., Dunn L.A., Upcroft P., Upcroft J.A. (2003): Efficacy of anti-giardial drugs. Expert Opin. Drug Saf. 2(6):529-541.
- 30 (15) Escobedo A.A & Cimerman S. (2007): Giardiasis: a pharmacotherapy review. Expert Opin. Pharmacother. 8(12): 1885-1902.
- (16) Harder A. y col. (2003) Cyclooctadepsipeptides - an anthelmintically active class of compounds exhibiting a novel mode of action. Int. J. Antimicrobial Agents. 22 : 318-331.
- (17) Mehlhom (ed) (2001) Giardiasis, Man; Encyclopedic Reference of Parasitology, Diseases, treatment, Therapy, segunda edición, Springer-Verlag, páginas 234-235.
- 35 (18) Hewlett, E.L., Andrews, J.S.Jr., Ruffier, J., Schaefer HI, F.W. (1982): experimental Infection of Mongroel Dogs with Giardia lamblia Cysts and Cultured Trophozoites En: The Journal of infectious diseases, Vol. 145, N°. 1, páginas 89-93

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de nifurtimox para la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades causadas por giardias.
2. Uso según la reivindicación 1 para el tratamiento de enfermedades causadas por *Giardia lamblia*.
- 5 3. Uso según una de la reivindicaciones 1 o 2 para el tratamiento de gatos o perros.
4. Nifurtimox para uso para el tratamiento de enfermedades causadas por giardias.
5. Nifurtimox para el uso según la reivindicación 4 para el tratamiento de enfermedades causadas por *Giardia lamblia*.
6. Nifurtimox para el uso según una de las reivindicaciones 4 o 5 en perros o gatos.
- 10 7. Agente que contiene nifurtimox y un antihelmíntico.
8. Agente que contiene nifurtimox y un ciclooctadepsipéptido antihelmíntico.
9. Agente según la reivindicación 8 que contiene PF 1022 como ciclooctadepsipéptido antihelmíntico.
10. Agente según la reivindicación 8 que contiene emodépsido como ciclooctadepsipéptido antihelmíntico.