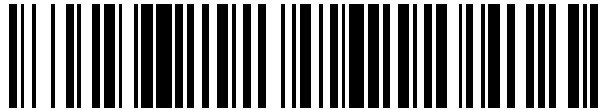


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 475 266**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/53** (2006.01)  
**A61K 31/505** (2006.01)  
**A61K 33/02** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 9/10** (2006.01)  
**A61K 49/00** (2006.01)  
**A61K 47/10** (2006.01)  
**G01N 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2009 E 09802583 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2319515**

54 Título: **Combinación coccidicida para uso veterinario**

30 Prioridad:

**31.07.2008 MX 2008009818**

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

**10.07.2014**

73 Titular/es:

**LABORATORIO AVI-MEX, S.A. DE C.V. (100.0%)  
Maíz No. 18 Col. Granjas Esmeralda Del.  
Iztapalapa  
México, D.F. 09810, MX**

72 Inventor/es:

**LOZANO-DUBERNARD, BERNARDO;  
OCAMPO-CAMBEROS, LUIS;  
SUMANO-LOPEZ, HÉCTOR SALVADOR;  
SOTO-PRIANTE, ERNESTO y  
SARFATI-MIZRAHI, DAVID**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 475 266 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

Combinación coccidicida para uso veterinario

Área técnica

5 La presente invención hace referencia a las técnicas utilizadas para la obtención y preparación de composiciones medicinas y fármacos de uso veterinario y zootécnico, y más en particular, hace referencia a una combinación coccidicida basada en el compuesto 1-metil-3-[3-metil-4-[4-(trifluorometil)ti]fenoxi]fenil]-1,3,5-triazina (1H,3H,5H)-2,4,6-triona, más conocido como toltrazurilo, y el compuesto 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]pirimidin-2,4-diamina, conocido como trimetoprim; donde ambos compuestos en combinación muestran un efecto sinérgico en la aceleración de la recuperación de la coccidiosis en aves y otros animales. Además, cuando se añade en el agua potable para su uso, la combinación de la presente invención presenta una estabilidad mejorada.

Antecedentes de la invención

15 La coccidiosis es una enfermedad que afecta al tracto digestivo de diversas aves, y mamíferos tales como ganado porcino, bovino, perros y gatos. Dicha enfermedad aviar está causada por protozoarios del género *Eimeria sp.*, del cual se han identificado 9 especies, siendo cuatro de ellas las de mayor incidencia en aves de corral en Méjico, principalmente en pollos, donde dichas cuatro especies son *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria necatrix* y *Eimeria tenella*, las cuales causan, año tras año, graves daños a la industria avícola.

20 Aunque se ha realizado una extensa investigación para el control y tratamiento de la coccidiosis, esta enfermedad parasitaria es aún una de las más costosas en la industria avícola. La coccidiosis se transmite por contacto directo o indirecto con heces infectadas de aves. En particular, cuando el ave ingiere tales protozoarios, también denominados coccidia, la enfermedad comienza invadiendo la mucosa intestinal del ave, causando lesiones en el tejido a medida que se reproduce. Alrededor de una semana después de la infección, los protozoarios producen descendientes denominados oocitos, los cuales, cuando son expulsados con las heces, no pueden infectar a otra ave hasta alcanzar un proceso de maduración (esporulación), lo que ocurre en un periodo de tiempo de uno a tres días. Si son ingeridos por otra ave tras la esporulación, los protozoarios son capaces de causar la infección.

25 La gravedad de la infestación dependerá de la patogenicidad de la cepa y de la cantidad de coccidias infecciosas ingeridas por el ave, por ejemplo, la infestación puede ser lo suficientemente leve para no ser perceptible, mientras que una cantidad muy elevada de coccidias puede causar lesiones graves que acaban en muerte. Las coccidias se transmiten fácilmente de un gallinero a otro mediante zapatos o ropa, aves en libertad, equipo, sacos de comida, insectos y roedores contaminados.

30 Aunque la coccidiosis en general tiene lugar en pollos que están en crecimiento y en adultos jóvenes, puede incluso ocurrir en otros estadios. Un brote de coccidiosis puede ser detectado en aves de aspecto débil y pálido con tendencia a agazaparse, que consumen menos comida y agua, con diarrea y signos de deshidratación. Las aves ponedoras con coccidiosis muestran puestas bajas.

35 Las lesiones producidas por la infestación dependen de la especie de coccidia, la gravedad y el estado de la enfermedad. La coccidiosis cecal puede causar tumefacción cecal, que se llena de sangre nueva. En un estadio posterior, el ciego se llena de un material de tipo caseoso, y adquiere un aspecto ensangrentado variable. La coccidiosis intestinal abarca desde una enteritis muy leve hasta una de tipo necrótico o hemorrágico.

40 Ahora bien, desde una perspectiva comercial, ya que un ave que ha tenido coccidiosis pierde la pigmentación de su piel, que se vuelve de color amarilloso debido a la falta de asimilación de los pigmentos incluidos en la comida cuando el ave está enferma, ésta pierde valor, entonces resulta crucial atacar la coccidiosis de manera efectiva.

45 En referencia a los métodos de prevención y control, resulta casi imposible prevenir la coccidiosis únicamente con una buena higiene. Por lo tanto, se han desarrollado en el arte previo composiciones anticoccidianas para atacar a este tipo de parásitos, siendo los productos anticoccidianos de naturaleza química o biológica. Según la vía de administración, los anticoccidianos químicos se clasifican generalmente como coccidicidas mezclados de forma habitual o añadidos a la comida de las aves, y anticoccidianos añadidos de manera habitual al agua de la que beben las aves.

Nicarbazina, sulfonamidas (sulfas), diclazurilo, etopabato, clopidol, decoquinato, robenidina, y ácido 3-nitro-4-hidroxifeliarsónico, además de compuestos ionóforos tales como maduramicina, salinomicina, lasalócido y monensina se encuentran entre los productos químicos que se añaden a la comida, que son en general de naturaleza preventiva.

Sulfonamidas, amprolio y toltrazurilo, entre otros, son productos químicos coccidicidas de naturaleza terapéutica. Además, también se han desarrollado vacunas, pero son de un menor uso general debido a los costes, las dificultades para su administración y su efectividad variable.

5 De los compuestos mencionados anteriormente, el toltrazurilo es sin lugar a dudas uno de los compuestos más empleados para el tratamiento de la coccidiosis en aves. A este respecto, las patentes Norteamericanas 4.631.218, 5.414.938 y 5.256.631, además de la patente Europea EP 1 246 624 revelan productos anticoccidianos que incluyen toltrazurilo. En el comercio, puede adquirirse toltrazurilo para uso aviar, por ejemplo, bajo la marca comercial Baycox® al 2,5% de Bayer. Esta formulación a base de toltrazurilo ha mostrado un rendimiento aceptable, sin embargo, siempre es deseable tener composiciones más efectivas que causen una recuperación más rápida de las  
10 aves que sufren de esta enfermedad, y menos efectos secundarios, es decir, los avicultores desean formulaciones más efectivas.

Por otro lado, sin embargo, el uso de formulaciones basadas en toltrazurilo ha mostrado problemas en cuanto a su administración, tales como una rápida precipitación en agua de las composiciones cuando se solubilizan, lo que causa una falta de asimilación por parte de las aves.

15 En otras palabras, tradicionalmente, la administración de toltrazurilo se ha llevado a cabo vertiéndolo y diluyéndolo en los recipientes que suministran agua a los bebederos de las aves, sin embargo, los bebederos están formados por tuberías y filtros de diámetro pequeño que pueden ser obstruidos por el toltrazurilo cuando precipita, por tanto, las aves no reciben las dosis adecuadas de medicamentos.

20 Además, el agua potable que tiene un contenido elevado de carbonato y sales, es decir, agua dura, es un problema adicional observado en muchas granjas avícolas, ya que el toltrazurilo pierde efectividad cuando se mezcla con este tipo de agua. De hecho, se calcula que el toltrazurilo pierde alrededor de un 60% de su efectividad cuando se mezcla con agua dura, siendo dicha agua muy común en la zona norte y central de Méjico, además de en muchas otras zonas de todo el mundo. Las consecuencias obvias son que las aves no reciben las dosis apropiadas de toltrazurilo activo, y que los avicultores requieren invertir dinero extra para comprar medicamento adicional para  
25 proporcionar a las aves las dosis de toltrazurilo recomendadas.

Entonces, para que el toltrazurilo comercialmente disponible mantenga su efectividad, requiere ser mezclado con agua que tenga bajo contenido en sales, y esta circunstancia difícilmente se cumple en Méjico y en otros países.

30 En resumen, se requieren composiciones coccidicidas que tengan una efectividad aumentada para una recuperación más rápida de los animales infectados con menos efectos secundarios, y composiciones coccidicidas que no pierdan efectividad cuando se mezclan con cualquier tipo de agua.

#### Breve descripción de la invención

35 Se ha observado que la combinación de 1-metil-3-[3-metil-4-[4-(trifluorometil)tio]fenoxi]fenil]-1,3,5-triazina (1H,3H,5H)-2,4,6-triona, más conocido como toltrazurilo; y el compuesto 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]pirimidin-2,4-diamina, conocido como trimetoprim, tiene un efecto sinérgico para el tratamiento de la coccidiosis. Esta combinación logró un efecto terapéutico aumentado para la coccidiosis durante ensayos experimentales, explicados más adelante, con respecto a cada compuesto en solitario; en particular, las aves mostraron signos de una recuperación más rápida con menos efectos secundarios con respecto a las composiciones del arte previo.

En un modo de realización preferente, la mejor relación en peso, según se observó, entre los componentes de la combinación de la presente invención se encuentra en el rango de 1:1 a 1:5 (trimetoprim/toltrazurilo).

40 En la invención se proporciona una composición coccidicida, que comprende toltrazurilo, trimetoprim y un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal composición se formula para su administración por vía oral. De manera preferible, se utiliza una solución o una suspensión para su administración por vía oral, donde la solución se forma mezclando con agua. La administración directa a la cavidad oral de cada animal es una vía de administración adicional de la composición.

45 También se revela el uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de una combinación formada por toltrazurilo y trimetoprim, para elaborar un medicamento útil en el tratamiento de la coccidiosis en aves y mamíferos. Además, se proporciona un método para el tratamiento de la coccidiosis en aves y mamíferos utilizando una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición formada por toltrazurilo y trimetoprim.

#### Breve descripción de los dibujos

50 Los aspectos novedosos considerados características de la presente invención se exponen en particular en las reivindicaciones anexas, sin embargo la combinación de la presente invención, la composición veterinaria y el uso

de las mismas como anticoccidiano se entenderá mejor a partir de la siguiente descripción detallada de ciertos modos de realización preferidos, cuando se leen en relación a los dibujos anexos, en donde:

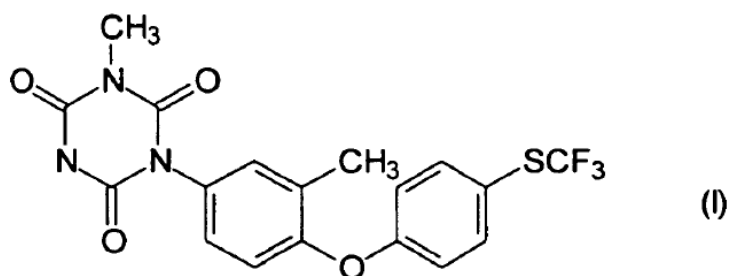
La Figura 1 es un gráfico que muestra los resultados obtenidos en ensayos comparativos *in vivo* utilizando un modo de realización de la combinación de la presente invención y las composiciones coccididas del arte previo, los ensayos se llevaron a cabo en fibroblastos de pollo.

Descripción detallada de los modos de realización preferidos de la invención

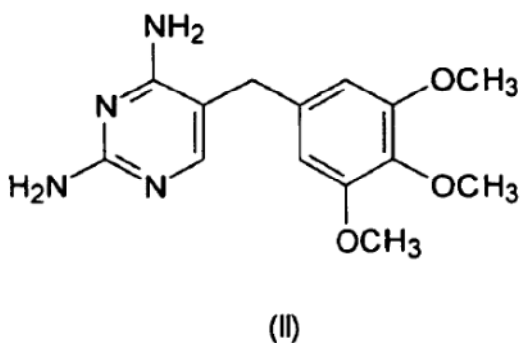
En la presente invención, se observó un efecto sinérgico para el tratamiento de la coccidiosis a partir de la combinación de 1-metil-3-[3-metil-4-[4-(trifluorometil)tió]fenil]-1,3,5-triazina (1H,3H,5H)-2,4,6-triona, de aquí en adelante denominado toltrazurilo; y el compuesto 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]pirimidin-2,4-diamina, de aquí en adelante denominado trimetoprim, que en particular ayuda a una recuperación más rápida de las aves enfermas y con menos efectos secundarios que cada compuesto en solitario. En un modo de realización preferido de la presente invención, se prefiere una relación en peso de trimetoprim con respecto al toltrazurilo de 1:1 a 5:1 (trimetoprim/toltrazurilo).

El primer componente de la combinación, toltrazurilo, es un derivado de la triazinetriona cuyo uso es bien conocido para prevenir y tratar la coccidiosis en pollos, pavos y cerdos mediante su administración en el agua de la que beben los animales o directamente en la cavidad oral.

El toltrazurilo tiene la siguiente estructura química (I).



Por otro lado, el segundo compuesto de la combinación de la presente invención, trimetoprim, tiene la siguiente estructura química (II):



El trimetoprim es un antibacteriano bacteriostático utilizado principalmente de forma profiláctica en las infecciones del tracto urinario. Durante el desarrollo de la presente invención, se encontró la mejor relación en peso entre ambos componentes, siendo de 1:1 a 5:1 (trimetoprim/toltrazurilo); por debajo de esta relación la combinación no tiene el efecto terapéutico que se requiere, y por encima de dicha relación puede ocurrir algún tipo de precipitación relacionada con la formulación, especialmente del trimetoprim.

Se formula una combinación veterinaria para la aplicación de la combinación de la presente invención, que emplea líquidos y sólidos orgánicos e inorgánicos como vehículos farmacéuticamente aceptables, seleccionados de almidón, lactosa, glucosa, sacarosa, dextrina, celulosa, parafina, agua, alcohol, polietilenglicol, propilenglicol, trietanolamina, goma arábica, carbopol, poloxámeros, quitosán, ciclodextrinas alfa, beta y gamma, dimetil sulfoxido, etc.

La composición veterinaria de la presente invención se formula para su administración por vía oral, más preferiblemente, se prefiere la formulación de la composición en forma de suspensión para su administración por vía

5 oral. Más aún, una suspensión para su administración por vía oral comprende de 20 a 30 mg de toltrazurilo por ml de suspensión; y de 20 a 150 mg de trimetoprim por ml de suspensión. Por debajo del valor mínimo indicado para cada componente, la composición simplemente no tiene la efectividad requerida, mientras que con valores más elevados especialmente del trimetoprim, la composición precipita. La suspensión o solución puede mezclarse con agua en una relación mayor o igual a 1:1000 (solución/agua), y puede tener un pH básico, preferiblemente, de 8,5 a 12,5.

La composición veterinaria formulada para su administración por vía oral puede ser aplicada a aves con 1 día de edad y mayores; para aquellas aves que tengan de 10 a 18 días, la composición puede ser administrada durante 1 o 2 días consecutivos. Las dosis recomendadas son de 5 a 10 mg/kg de peso durante dos días consecutivos.

10 De acuerdo a la presente invención, la combinación con efectos sinérgicos de toltrazurilo y trimetoprim se utiliza para elaborar un medicamento veterinario útil en el tratamiento de la coccidiosis en aves y mamíferos, más en particular, se prefiere su aplicación en aves de corral seleccionadas del grupo que consiste en pollos, pavos, patos y gansos, más preferiblemente aplicado a pollos.

15 La combinación de la presente invención, su uso en una combinación farmacéutica y su efecto sinérgico cuando se aplica a las aves, será mejor ilustrada mediante los siguientes ejemplos, que deben considerarse únicamente como ilustrativos y no limitativos de la invención.

### Ejemplos 1-6

Ensayos comparativos *in vivo* para la efectividad

20 Se utilizaron fibroblastos de pollo de la *línea celular CS-3*, *línea Rho0*, para evaluar la eficacia *in vitro* de la combinación de la presente invención, [Gurnett et al., 1995 A.M. Gurnett, P.M. Dulski, S.J. Darkin-Rattray, M.J. Carrington and D.M. Schmartz, Selective labeling of intracellular parasite proteins by using ricin, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 2388-2392], los fibroblastos se mantuvieron a 41°C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5% en medio Ham F-12-Glutamax, complementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100 UI/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, 50 mg/ml de uridina y 1 mM de piruvato sódico.

25 *Eimerias*.- Se mantuvieron cultivos no esporulados de oocitos de *Eimeria tenella* de la cepa PAPt37, obtenidos del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se obtuvieron esporocitos mediante enquistamiento de oocitos esporulados, tal como se describe en Dulsky y Turner, 1988 P. Dulski and M. Turner. The Purification of sporocysts and sporozoites from *Eimeria Tenella* oocysts using Percoli density gradients, Avian Diseases 32 (1988), pp. 235-239. Se purificaron merozoitos del contenido cecal 108 h después de la inoculación de pollos experimentales con una carga de 10<sup>6</sup> oocitos, según se sugiere por Binger et al., 1993 M.H. Binger, D. Hug, G. Weber, E. Schildknecht, M. Humbelin y L. Pasamontes, en "Cloning characterization of a surface antigen of *Eimeria Tenella* merozoites and expression using a recombinant vaccinia virus", Molecular and Biochemical Parasitology 61 (1993), pp 179-187.

La eficacia anticoccidiana de las siguientes mezclas se comparó con las concentraciones especificadas.

35 Ejemplo 1. Maduramicina (10 mg/ml) (como testigo de la eficacia del ensayo)

Ejemplo 2. Toltrazurilo (5 mg/ml)

Ejemplo 3. Trimetoprim + toltrazurilo (5 mg/ml + 1 mg/ml)

Ejemplo 4. Maduramicina + toltrazurilo (5 mg/ml + 5 mg/ml)

Ejemplo 5. Toltrazurilo + diacetato de diminazeno (5 mg/ml + 10 mg/ml)

40 Ejemplo 6. Toltrazurilo + pirimetamina (5 mg/ml + 2 mg/ml)

*Bioensayos*.- Los estudios de la infección comenzaron con el cultivo de *E. tenella*, formando placas de fibroblastos en viales de cultivo tisular, con un inóculo inicial de 100 ml de una suspensión de 8 x 10<sup>4</sup> células, las células se cultivaron durante 48 horas a 41°C. Además, se infectaron con esporocitos de *E. tenella* en una relación aproximada de 3 esporocitos por célula. Los siguientes sub-grupos para cada fármaco o mezcla de fármacos fueron dispuestos por triplicado para cada ejemplo 1 a 6.

A. Fibroblastos + esporocitos únicamente

B. Fibroblastos + esporocitos + maduramicina (ejemplo 1)

C. Fibroblastos + esporocitos + mezcla de ensayo (ejemplos 2 a 6)

5 A las 24 horas de incubación, el medio de cultivo se retiró cuidadosamente, las células se secaron con nitrógeno líquido inyectado en los viales, y se fijaron con formalina neutra al 10%. Se recortó la parte inferior de los viales y se procedió a la tinción de los cultivos con hematoxilina-eosina. Los cultivos fueron analizados con un microscopio a 40 X y fueron cuantificados, las células presentaban una estructura afectada o infectada en 9 campos, distinguibles de las células no alteradas. Se realizó un análisis estadístico no paramétrico U de Mann-Whitney.

10 **Resultados.-** Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 1, como  $X \pm 1$  DE (Desviación estándar). El análisis estadístico reveló que el grupo del Ejemplo 3, toltrazurilo-trimetoprim, es estadísticamente mejor a la hora de proteger los fibroblastos de la destrucción por esporocitos de la *Eimeria tenella* ( $P < 0,01$ ).

Tabla 1

| Repetición      | Ejemplo 1<br>(±DE) | Ejemplo 2<br>(±DE) | Ejemplo 3<br>(±DE) | Ejemplo 4<br>(±DE) | Ejemplo 5<br>(±DE) | Ejemplo 6<br>(±DE) |
|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| A               | 268 (29)           | 999 (12)           | 2569 (26)          | 879 (28)           | 789 (25)           | 945 (23)           |
| B               | 156 (35)           | 899 (8)            | 2687 (28)          | 985 (26)           | 1002 (23)          | 1021 (28)          |
| C               | 239 (21)           | 789 (6)            | 2459 (32)          | 875 (34)           | 985 (30)           | 1106 (20)          |
| Media de medias | 221 (58)           | 895 (105)          | 2571 (114)         | 913 (62)           | 925 (118)          | 1024 (80)          |

Los datos anteriores se muestran en forma de un histograma de frecuencia en la Figura 1.

15 Según los ensayos anteriores, el sistema establecido es capaz de detectar diferencias de actividad *in vitro* de los diferentes ingredientes activos. La combinación toltrazurilo-trimetoprim (ejemplo 3) es sinérgica para destruir la *Eimeria sp* y para mejorar la viabilidad de las células hospedadoras o “diana”, lo que se traduciría en un menor padecimiento de las aves de los efectos de la enfermedad, y en que tengan una recuperación más rápida.

**Ejemplo 7**

Ejemplo comparativo de los ensayos *in vivo*

20 En particular, para comparar la efectividad de la presente invención con respecto al fármaco comercial Baycox® 2,5% (Bayer de Méjico), se utilizó una dosis de 1 ml/L de una suspensión preparada de acuerdo a la Tabla 2 y una dosis del producto disponible comercialmente Baycox®, en los días quinto y sexto posteriores a la inoculación, en pollos del experimento infectados con *E. tenella*.

Tabla 2

| Composiciones utilizadas en el Ejemplo 3 |           |
|--|-----------|
| Componentes                              | Ejemplo 3 |
| Toltrazurilo                             | 0,5%      |
| Trietanolamina                           | 30%       |
| Polietilenglicol                         | 57,5%     |
| trimetoprim                              | 2,5%      |
| Etanol                                   | 7,5%      |
| pH                                       | 11,2      |

25 Más en particular, se utilizaron 180 pollos de engorde (machos) disponibles comercialmente de 1 día de edad y únicamente de un género, donde dichos pollos de engorde se criaron juntos hasta la 3ª semana. A partir de esta fecha, se formaron 3 grupos en base a la uniformidad en su peso.

Para la etapa de crecimiento 1-28, se utilizó comida disponible comercialmente para pollos de engorde con un anticoccidiano. A partir de la fecha de la formación del grupo, en el día 28 y hasta la fecha del sacrificio de las aves en el día 35, se administró comida de iniciación para pollos de engorde sin anticoccidiano. La alimentación fue en todo momento *ad libitum* (no restringida), al igual que el agua.

- 5 Los pollos de engorde se criaron en jaulas de alambre 40 cm de alto, 50 cm de ancho y 1 m de largo, durante 1 a 28 días. El mismo equipo se utilizó cuando se formaron los grupos de ensayo en los días 21 a 28.

Cada grupo tenía 30 pollos de engorde, con un total de dos repeticiones. Los pollos de engorde se pesaron para tener grupos lo más uniformes posible. Los tres grupos formados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

| Grupos Formados |   |                    |                     |
|-----------------|---|--------------------|---------------------|
| Grupo           | Tratamiento   | Comida             | Repeticiones/pollos |
| 1               | Tratado con la suspensión de la presente invención – 2 días, a partir del quinto día posterior a la inoculación. Dosis 1 ml/L | Sin anticoccidiano | 2 x 30 cada uno     |
| 2               | Tratado con Baycox® -- 2 días, a partir del quinto día posterior a la inoculación. Dosis 1 ml/L                               | Sin anticoccidiano | 2 x 30 cada uno     |
| 3               | Inoculado no tratado  | Sin anticoccidiano | 2 x 30 cada uno     |

- 10 Se administró un inóculo fresco basado en una cepa silvestre de *E. tenella*, administrando una dosis de 100.000 oocitos esporulados por la propia ave. El inóculo titulado esporulado se administró directamente en el pico del ave mediante deposición en el proventrículo con la ayuda de una sonda rígida con una jeringuilla graduada a los 28 días de edad.

- 15 Con 35 días, todos los pollos de engorde se pesaron y se sacrificaron. Se realizó autopsia para cada pollo de engorde, y las lesiones en el ciego se valoraron de acuerdo a la escala de Johnson y Reid. Con los valores obtenidos en la valoración de las lesiones, se realizó un análisis de varianza (Kruskal-Wallis) mediante el programa estadístico SAS:

Los parámetros medidos fueron los siguientes:

- 20
- Media de peso por grupo en el momento de la inoculación (28 días)
  - Media de peso por grupo en el momento del sacrificio (35 días)
  - Ingestión de comida acumulada en la etapa de exposición (por tratamiento)
  - Índice de conversión por tratamiento
  - Valoración de las lesiones de todos los pollos de engorde y media por tratamiento
- 25
- Media de lesiones por tratamiento
  - Signos y mortalidad

Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4 a 7.

Tabla 4

| <b>Ganancia de peso</b>  |                                  |                                |                              |
|--|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <b>Tratamientos</b>  | <b>Media inicial de peso/ave</b> | <b>Media Final de peso/ave</b> | <b>Media de ganancia/ave</b> |
| Tratado con la suspensión de la presente invención – 2 días, a partir del quinto día después de la inoculación. Dosis 1 ml/L | 520                              | 695                            | 175                          |
| Tratado con Baycox® -- 2 días, a partir del quinto día posterior a la inoculación. Dosis 1 ml/L                              | 525                              | 694                            | 169                          |
| INOCULADO NO TRATADO   | 525                              | 640                            | 115                          |

Tabla 5

| <b>Índice de conversión de la alimentación</b> |                               |                          |                      |
|--|-------------------------------|--------------------------|----------------------|
| <b>Tratamiento</b>                             | <b>Media de ingestión/ave</b> | <b>Media de peso/ave</b> | <b>Media de I.C.</b> |
| Tratado con la suspensión                      | 376                           | 147                      | 2,55                 |
| Baycox®  | 385                           | 125                      | 3,08                 |
| Testigo  | 371                           | 124                      | 2,99                 |

5

Tabla 6

| <b>Nivel medio de lesiones por grupo en relación al control</b> |                                    |  |
|---|------------------------------------|--|
| <b>Grupo</b>  |                                    | <b>Total</b>                           |
| Tratado con la suspensión                                       | 8/20 1+=8; 10/20 3+=30; 2/20 4+=8  | Nivel 46 – 19 en referencia al control |
| Baycox®   | 3/20 1+=3; 14/20 3+=42; 3/20 4+=12 | Nivel 57 – 8 en referencia al control  |
| Testigo o control   | 15/20 3+=45; 5/20 4+=20            | Nivel 65                               |

Tabla 7

| <b>Signos de mortalidad y clínicos (5° y 6° día posterior a la inoculación)</b> |                         |                   |
|---|-------------------------|-------------------|
|   | <b>Heces con sangre</b> | <b>Mortalidad</b> |
| Tratados con la suspensión  | +                       | 3/20 (15%)        |
| Baycox®   | ++                      | 3/20 (15%)        |
| Testigo   | +++                     | 5/20 (25%)        |

10

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) a partir de los valores observados en la valoración de lesiones, se observaron diferencias significativas  $P < .05$  entre el grupo infectado no tratado con relación a ambos tratamientos. En particular, la ganancia de peso y el nivel de lesiones utilizando la composición de la presente invención muestra resultados ventajosos con respecto a los del tratamiento disponible comercialmente del producto Baycox®.



- 5 El comportamiento sinérgico de la presente invención podría explicarse tal como sigue a continuación: el toltrazurilo y el trimetoprim son capaces de estimular la muerte de esquizontes en la coccidiasis, inhibiendo la cadena respiratoria, en particular en el nivel de la citocromo-C reductasa y NADH oxidasa, además de a través de la succinato oxidasa. En las aves, la síntesis de pirimidina se basa bastante en la reductasa del ácido dihidrofólico; y, el efecto del trimetoprim y el toltrazurilo es 500 veces más débil con respecto a las coccidias, por tanto estos fármacos previenen una posible toxicidad [Harder A; Haberkorn A posible mode of action of toltrazuril: studies on two Eimeria species and mammalian and Ascaris suum enzymes. Parasitol Res 1989; Vol. 76 (1), pp. 8-12]. Entonces, puede percibirse que se logra un doble efecto sobre los mismos grupos enzimáticos, disminuyendo, por tanto, la generación de cepas resistentes de *Eimeria sp.*
- 10 [0050] En el área clínica, las lesiones y los signos de diarrea con sangre en la autopsia desaparecen más rápido con la combinación de la presente invención, debido al doble efecto de los dos fármacos mencionados anteriormente sobre los sistemas oxidativos, a los cuales las *Eimerias* no generarían resistencia.

### Ejemplos 8 y 9

Ensayos en agua dura con una concentración variable de trimetoprim

- 15 Se prepararon dos composiciones veterinarias de acuerdo a los porcentajes detallados en la Tabla 8, con el propósito de analizar el comportamiento de la composición en agua dura cuando se varía la concentración de trimetoprim.

- 20 Cada composición veterinaria se preparó como sigue a continuación: en un recipiente que contiene polietilenglicol se añadió lentamente una cantidad predeterminada de trimetoprim hasta la concentración indicada en la Tabla 8, y se mezcló durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió trietanolamina y se mezcló durante 5 minutos más, entonces, se añadió una cantidad suficiente de toltrazurilo para lograr la concentración indicada en la Tabla 8, y se mezcló adicionalmente durante 5 minutos. A continuación, se añadió etanol y se cubrió el recipiente, la mezcla se calentó con agitación a 40°C durante 30 minutos más. Al final de esta operación, se produjo una suspensión de aspecto blanco turbio.

- 25 Tabla 8

| <b>Composiciones empleadas en los ejemplos 8 y 9</b> |                                    |                                      |
|--|------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Componentes</b>                                   | <b>Ejemplo 8 Trimetoprim al 5%</b> | <b>Ejemplo 9 Trimetoprim al 2,5%</b> |
| Toltrazurilo   | 2,5%                               | 2,5%                                 |
| Trietanolamina                                       | 30%                                | 30%                                  |
| Polietilenglicol                                     | 57,5%                              | 57,5%                                |
| Trimetoprim  | 5%                                 | 2,5%                                 |
| Etanol   | 5%                                 | 7,5%                                 |
| pH   | 12,5                               | 11,2                                 |

Cada una de las composiciones veterinarias en los Ejemplos 8 y 9 se diluyó con agua con diferentes niveles de dureza, tal como se indica en la Tabla 9, en donde la solubilidad y precipitación se determinó de manera cuantitativa para las composiciones de los Ejemplos 8 y 9.

- 30 Tabla 9

| <b>Valoración de la solubilidad y precipitación</b> |           |                                    |                                    |                          |                           |                          |                            |
|---|-----------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>Tipo de agua</b>                                 | <b>pH</b> | <b>Cantidad administrada Ej. 8</b> | <b>Cantidad administrada Ej. 9</b> | <b>Solubilidad Ej. 8</b> | <b>Precipitación Ej.9</b> | <b>Solubilidad Ej. 8</b> | <b>Precipitación Ej. 9</b> |
| No dura   | 7,5       | 0,1%                               | 0,2%                               | +                        | +++                       | +++                      | +                          |
| Dura  | 8,5       | 0,1%                               | 0,2%                               | +                        | +++                       | +++                      | +                          |

Tabla 9 (continuación)

| <b>Valoración de la solubilidad y precipitación</b>                  |     |                                |                                |                      |                       |                      |                        |
|--|-----|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|
| Tipo de agua   | pH  | Cantidad administrada<br>Ej. 8 | Cantidad administrada<br>Ej. 9 | Solubilidad<br>Ej. 8 | Precipitación<br>Ej.9 | Solubilidad<br>Ej. 8 | Precipitación<br>Ej. 9 |
| Muy dura   | 8,7 | 0,1%                           | 0,2%                           | +                    | +++                   | +++                  | +                      |
| +++ alta precipitación; ++ precipitación media; + precipitación baja |     |                                |                                |                      |                       |                      |                        |

De acuerdo con los resultados observados, la composición preparada de acuerdo al Ejemplo 9 (Trimetoprim al 2,5%) presentó la solubilidad más elevada en los tres tipos de agua que la de la composición del Ejemplo 8.

- 5 No se predijo problema alguno cuando las composiciones fueron administradas en agua dura, ya que se prepararon con un pH básico o alcalino, puesto que el agua también tiene pH alcalino, por tanto, no es de esperar que ocurra ionización alguna de ningún ingrediente activo, evitando por tanto cualquier afectación del sistema de tuberías del agua de suministro. El componente de la composición propenso a la sedimentación es el trimetoprim.

#### Ejemplo 10

- 10 Solubilidad con dosis variables y variando la concentración de agua dura

Se preparó una suspensión de acuerdo a la presente invención con toltrazurilo al 2,5% y trimetoprim al 0,5%, lo que da como resultado un pH de 10,7, que fue comparado con el producto disponible comercialmente Baycox® (Bayer de México) con toltrazurilo al 2,5% y un pH de 9,3. Ambos se sometieron a prueba a diferentes dosis en agua con diferente concentración de dureza medida como partes por millón (ppm) de carbonato cálcico, con el propósito de verificar la solubilidad o precipitación de ambos compuestos una vez utilizados en instalaciones ganaderas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10.

- 15

Tabla 10

| <b>Solubilidad de los compuestos con Toltrazurilo al 2,5%</b> |                       |  |           |           |
|---|-----------------------|--|-----------|-----------|
| Dureza del agua:  | Producto              | Dosis: litros de producto/litros de agua |           |           |
|   |                       | 1/100                                    | 1/250     | 1/500     |
| 100 ppm de CaCO <sub>3</sub> en 1 litro de agua               | Suspensión del Ej. 10 | Soluble                                  | Soluble   | Soluble   |
|   | Baycox®               | Precipita                                | Precipita | Precipita |
| 500 ppm de CaCO <sub>3</sub> en 1 litro de agua               | Suspensión del Ej. 10 | Soluble                                  | Soluble   | Soluble   |
|   | Baycox®               | Precipita                                | Precipita | Precipita |
| 1000 ppm de CaCO <sub>3</sub> en 1 litro de agua              | Suspensión del Ej. 10 | Soluble                                  | Soluble   | Soluble   |
|   | Baycox®               | Precipita                                | Precipita | Precipita |
| 1500 ppm de CaCO <sub>3</sub> en 1 litro de agua              | Suspensión            | Soluble                                  | Soluble   | Soluble   |
|   | Baycox®               | Precipita                                | Precipita | Precipita |

- 20 Aunque en la descripción anterior se han mostrado y descrito algunos modos de realización preferidos de la presente invención, debe señalarse que son posibles diversas modificaciones de las mismas, por ejemplo, el vehículo farmacéutico o la vía de administración de la composición veterinaria. La presente invención puede tomar varias formas, con la condición de que se mantengan los mismos componentes.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición coccidicida del tipo que comprende toltrazurilo: 1-metil-3-[3-metil-4-[4-(trifluorometil)tio]fenoxi]fenil]-1,3,5-triazina (1H,3H,5H)-2,4,6-triona); trimetoprim: 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]pirimidin-2,4-diamina; y, un vehículo farmacéuticamente aceptable; con un pH básico, **caracterizado porque** la composición es una suspensión oral que comprende de 20 a 30 mg de toltrazurilo por ml de suspensión; y de 20 a 150 mg de trimetoprim, por ml de suspensión.
2. Composición coccidicida según la reivindicación 1, adicionalmente **caracterizada porque** el pH de la composición es de 8,5 a 12,5.
- 10 3. Composición coccidicida según la reivindicación 1, adicionalmente **caracterizada porque** la suspensión se aplica directamente en la cavidad oral.
4. Composición coccidicida veterinaria según la reivindicación 1, adicionalmente **caracterizada porque** la suspensión está diluida con agua a partir de una relación mayor o igual a 1:1000 (suspensión/agua)
5. Uso de una composición según se reivindica en la reivindicación 1, para elaborar un medicamento útil en el tratamiento de la coccidiosis en aves o mamíferos.
- 15 6. Uso según se reivindica en la reivindicación 5, en donde las aves son aves de corral seleccionadas del grupo que comprende pollos, pavos, patos y gansos.
7. Uso según se reivindica en la reivindicación 6, en donde las aves de corral son pollos.

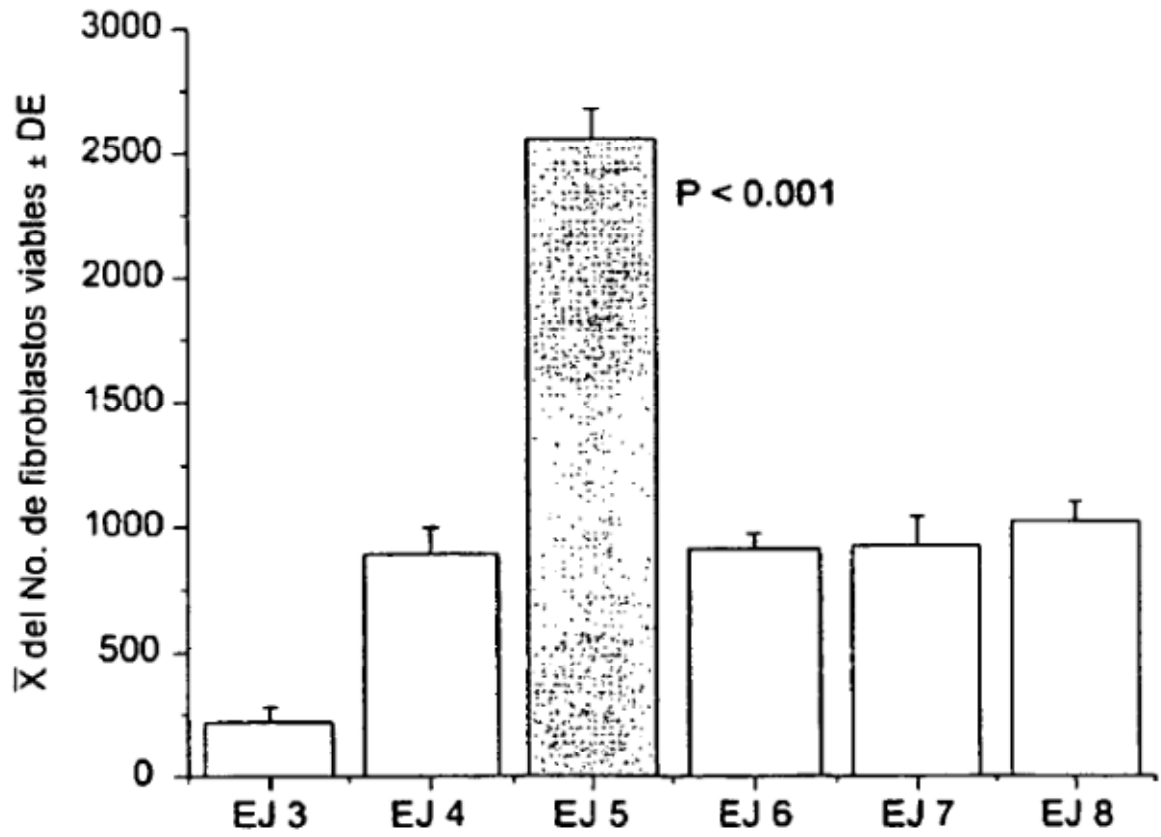


FIG. 1