



(12) **Oversettelse av  
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2310017 B1**

**NORGE**

(19) NO  
(51) Int Cl.  
**A61K 31/541 (2006.01)**  
**A61P 33/02 (2006.01)**

**Patentstyret**

---

|      |                                                                               |                                                                                                                                                                                 |
|------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) | Oversettelse publisert                                                        | 2013.07.29                                                                                                                                                                      |
| (80) | Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet | 2013.05.15                                                                                                                                                                      |
| (86) | Europeisk søknadsnr                                                           | 09772098.1                                                                                                                                                                      |
| (86) | Europeisk innleveringsdag                                                     | 2009.06.20                                                                                                                                                                      |
| (87) | Den europeiske søknadens Publiseringsdato                                     | 2011.04.20                                                                                                                                                                      |
| (30) | Prioritet                                                                     | 2008.07.02, DE, 102008031283                                                                                                                                                    |
| (84) | Utpekte stater                                                                | AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR<br>HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL<br>PT RO SE SI SK TR                                                                  |
| (73) | Innehaver                                                                     | Bayer Intellectual Property GmbH, Alfred-Nobel-Strasse 10, 40789 Monheim, DE-Tyskland                                                                                           |
| (72) | Oppfinner                                                                     | HARDER, Achim, Europaring 54, 51109 Köln, DE-Tyskland<br>GREIF, Gisela, Marienhöhe 15, 53424 Remagen, DE-Tyskland<br>FROYMAN, Robrecht, Heerweg 112, 40789 Monheim, DE-Tyskland |
| (74) | Fullmektig                                                                    | Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge                                                                                                                 |

---

|      |                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (54) | Benevnelse            | <b>Nifurtimox for behandling av sykdommer som skyldes Trichomonadida</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| (56) | Anførte publikasjoner | EP-A- 0 382 173<br>US-A- 3 262 930<br>HARDER A ET AL: "Mechanisms of action of emodepside" PARASITOLOGY RESEARCH ; FOUNDED AS ZEITSCHRIFT FÜR PARASITENKUNDE, SPRINGER, BERLIN, DE, Bd. 97, Nr. 1, 1. Oktober 2005 (2005-10-01), Seiten S1-S10, XP019345740 ISSN: 1432-1955<br>HU J ET AL: "The efficacy of some drugs with known antiprotozoal activity against Histomonas meleagridis in chickens" VETERINARY PARASITOLOGY, ELSEVIER SCIENCE, AMSTERDAM, NL, Bd. 121, 1. Januar 2004 (2004-01-01), Seiten 233-238, XP002483749 ISSN: 0304-4017<br>MCDUGALD L R: "BLACKHEAD DISEASE (HISTOMONIASIS) IN POULTRY: A CRITICAL REVIEW" AVIAN DISEASES, AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGISTS, KENNET SQ., PA, US, Bd. 49, Nr. 4, 1. Dezember 2005 (2005-12-01), Seiten 462-476, XP009069336 ISSN: 0005-2086<br>MCKELLAR Q A ET AL: "Veterinary anthelmintics: old and new" TRENDS IN PARASITOLOGY, ELSEVIER CURRENT TRENDS, Bd. 20, Nr. 10, 1. Oktober 2004 (2004-10-01), Seiten 456-461, XP004560074 ISSN: 1471-4922<br>MONZOTE L: "A review of anti-parasitic patents (1988-2008)" RECENT PATENTS ON ANTI-INFECTIVE DRUG DISCOVERY 2008 GB, Bd. 3, Nr. 3, 2008, Seiten 177-191, XP009123144 ISSN: 1574-891X<br>RAETHER W ET AL: "Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity." PARASITOLOGY RESEARCH, Bd. 90, Nr. Supplement 1, Juni 2003 (2003-06), Seiten S19-S39, XP002547457 ISSN: 0932-0113 in der Anmeldung erwähnt |

Den foreliggende oppfinnelse gjelder anvendelse av nifurtimox for behandling av sykdommer som skyldes Trichomonadida, for eksempel histomoniasis, fortrinnsvis hos kalkun.

Aktiviteten av nitroheterosykliske forbindelser mot protozo-overførte sykdommer er i prinsippet kjent.

Protozoene er mononukleære organismer som har grunnstrukturen til eukaryote celler. I den nøyaktige systematikken foreligger imidlertid store forskjeller i levevis, morfologi og det biokjemiske stoffskiftet mellom de enkelte stammene, klassene, slektene og artene. Derfor virker kjemiske stoffer, alt ut fra angrepspunkt og virkeprinsipp, vanligvis ikke på samme måte på alle protozoer, men bare mot spesielle grupper av protozoer (2, 3, 4).

Til nå har aktivitet av nifurtimox kun blitt beskrevet mot protozo-arter fra slekten Trypanosoma, f.eks. *Trypanosoma brucei* og *Trypanosoma cruzi* (5, DE-AS-1 170 957). Trypanosomer har et flimmerhår som har sitt utspring i basallegemet ("kinetosom", derav ordenen Kinetoplastida) og som sammen med basallegemet danner en undulerende membran. Trypanosomer formerer seg hovedsakelig i blodplasma og overføres av blodsugende artropoder. Disse patogene organismene er årsaken til Chagas' sykdom (trypanosomiasis) hos mennesket. Nifurtimox er for tiden nesten den eneste forbindelsen som er effektiv mot disse patogene organismene. Denne aktiviteten beror formodentlig på inhibering av trypanotion reduktase, et spesielt enzym hos trypanosomer. Dette enzymet mangler hos andre patogene protozoer, nærmere bestemt trikomonader og histomonader.

Aktivitet av nifurtimox har til nå ikke blitt beskrevet innen ordenen Trichomonadida og Diplomonadida. Trichomonadida er gjennomgående parasittiske protozoer som typisk har flere, som regel 4 til 6 flageller. En stor morfologisk særegenhet er en kontraktile stav (= costa) i organismens indre som deltar i bevegelser. I motsetning til kinetoplastidene har Trichomonadida ikke mitokondrier, som er viktige organeller for energistoffskiftet. Energistoffskiftet skjer i stedet i såkalte hydrogenosomer. I disse organellene er oksidativ dekarboksylering av pyruvat koblet til ATP-syntese og en ferredoksin-styrt elektrontransport (6). Formeringen av disse encellede parasittene skjer ved todeling. Ingen seksuelle stadier eller cyster opptrer. Til ordenen Trichomonadida hører flere slekter (nærmere bestemt slektene Trichomonas og Histomonas) og videre flere arter, imidlertid er de fleste av disse er ganske harmløse og ikke-patogene. Likevel finnes det representanter som forårsaker alvorlige sykdommer og som fører til betydelige økonomiske tap innen husdyrhold. Til disse regnes slekten Trichomonas (spesielt *T. gallinae* og *T. gallinarum*), slekten Tritrichomonas (spesielt *T. foetus* og *T. suis* og slekten Histomonas (spesielt *H. meleagridis*).

Ved trikomonose hos duer og høns dreier det seg om en infeksjonssykdom som forårsakes av *Trichomonas gallinae* og *Trichomonas gallinarum*. *T. gallinae* parasitterer primært i strupen, i spiserøret og i kråsen. I løpet av sykdommen rammes imidlertid også andre organer, fremfor alt lever, hjerte og lunge. Infeksjonen av unge  
 5 dyr skjer allerede ved første foring med kråsmelk fra latent infiserte eldre dyr. Andre infeksjonskilder er forurenset drikkevann eller for. Sykdommen regnes som den hyppigste sykdom hos unge duer og medfører store skader, særlig i avlsbestander. I tillegg til den høye dødeligheten opptrer fordøyelsesforstyrrelser, manglende appetitt, hindret opptak av drikkevann og næring samt begrenset evne til å fly. *Trichomonas*  
 10 *gallinarum* parasitterer blindtarmen hos høns og kalkun. Sykdommen fører til vekstforstyrrelser, alvorlig diaré og nekrotisk betennelse av leveren.

Ved histomoniasis dreier det seg om en infeksjonssykdom som forårsakes av *Histomonas meleagridis*. Histomonader er tarmparasitter. Spesielt viktig er histomoniasis hos kalkun, man taler i dette tilfelle om såkalt smittsom leverblindtarms-  
 15 betennelse (blackhead). Hos kalkun forårsakes sykdommen særlig av den patogene *Histomonas meleagridis*. I tillegg til kalkun kan også høns, perlehøns, påfugl, fasaner, raphøns og vaktler rammes av den patogene organismen og regnes som reservoar-  
 verter.

Gjennom *Histomonas meleagridis*-infeksjonen opptrer en alvorlig blindtarm-  
 20 og leverbetennelse, siden sykdomsfremkalleren skader tarmvevet og via blodet når leveren, hvor den fører til nekrosedannelse. Som bivirkning av sykdommen opptrer ofte kretsløpsforstyrrelser som kan identifiseres ut fra de blåsvarte hodene til syke dyr, noe som har gitt sykdommen dens navn i mange språk.

I infiserte bestander, f.eks. i fugleavlsbedrifter, sprer sykdommen seg svært  
 25 hurtig i hele bestanden og fører grunnet svært høy dødelighet (i noen tilfeller opp til 100 %) til store økonomiske tap.

*Histomonas meleagridis* tilhører grunnet sine strukturelle flimmerhår understammen Flagellater (Mastigophora) og ordenen Trichomonadida. Stadiene med flimmerhår formerer seg i blindtarmen ved todeling. Amøboidlignende stadier bander  
 30 seg vei fra den infiserte blindtarmen til leveren via blodbanen og ødelegger denne ved omfattende nekroser (7).

Overføring av histomonader via den direkte vei, f.eks. oralt opptak av histomonadeholdig, fersk avføring, er sjelden, siden smitteorganismen kun er levedyktig i kort tid utenfor verten og i de fleste tilfeller avstøtes i løpet av passasjen  
 35 gjennom fordøyelseskanalen. Undersøkelser gjort av amerikanske forskere viste at i forsøk på dyr skjer en infeksjon av kalkun via kloakken vesentlig lettere enn via den orale vei. Siden det etter avføring oppstår et svakt undertrykk i kloakken er en infeksjon via denne veien under praktiske forhold sannsynlig, for eksempel via forurenset halm. Overføring av sykdomskilden via mellomverter er entydig

vitenskapelig påvist. Den mest kjente overføreren (særlig som transportvektor av *Histomonas meleagridis*) er blindtarmormen *Heterakis gallinarum* (egg eller larver). Histomonader kan forbli infeksiose i opp til 4 år i embryoholdige Heterakis-egg. Andre mellomverter kan være meitemark og artropoder som er kontaminert med Heterakis-egg. Også høns og annet fjærkre utgjør en potensiell fare. De er mindre ømfintlige enn kalkun og er ofte bærere av den patogene organismen uten påfallende kliniske tegn, på denne måten bidrar de til å utbre sykdomsårsaken.

Kalkun kan infiseres uavhengig av alder, imidlertid opptrer sykdommen hyppigst mellom 3. og 12. leveuke. Tidsrommet mellom infeksjon og sykdomsutbrudd utgjør maksimalt 7-12 dager. Dødeligheten kan nå opp til 100 % og når sitt høyeste punkt på dag 17 etter infeksjonen. På dag 8 kan betennelse påvises i blindtarmen og på dag 19 i leveren.

Infiserte dyr er kraftløse og utmattede, henger med vinger og hode og nekter å spise. Typisk er avsetting av svovelgule ekskrementer, diaré og senere også blod i avføringen. Kretsløpsforstyrrelsene som opptrer sammen med sykdommen fører til en utpreget blåsvart farge på hodet, noe som har gitt sykdommen sitt navn i mange språk.

Sykdomsforløpet avgjøres først og fremst av kalkunenes alder og tarmflora. Tilleggsinfeksjon med bakterier som *E. coli*, *Clostridium perfringens* eller koksidier kan forverre forløpet (8).

Diagnosen av histomoniasis kan skje i native preparater fra blindtarm og lever ved hjelp av en koksaltløsning. Amøboide, bevegelige stadier kan observeres i fasekontrastmikroskop. PAS-farging benyttes histologisk.

Frem til 1950 var arsenforbindelser (f.eks. nitarson, carbarson, roxarson) de eneste aktive preparatene mot histomoniasis. Det er imidlertid kjent at arsenforbindelser generelt ikke er tilstrekkelige aktive for behandling av allerede etablerte infeksjoner. En annen ulempe er den ekstremt lave sikkerhetsindeksen: allerede en 2 gangers dosering av roxarson fører til forstyrrede motoriske funksjoner hos kalkun.

Fra 1960 ble andre nitroimidazoler eller nitrofuraner benyttet, f.eks. i fôr eller drikkevann, men disse ble imidlertid i økende forbudt benyttet i husdyr og som fôrtilsetning i EU og USA fra midten av 90-tallet: dimetridazol ble trukket fra markedet i USA i 1997 og forbudt anvendt som fôrtilsetning i EU i 2001. Fra og med 31.03.2003 kan heller ikke nifursol, det eneste produktet som fortsatt var tillatt i EU, lenger benyttes, grunnet sikkerhetsbetenkeligheter. Fra da av og fremover står bare preparater for forebyggende bekjempelse av histomoniasis til disposisjon; ingen legemidler for behandling.

De eneste tilgjengelige strategiene for å unngå sykdom har siden da bestått i hygieniske tiltak, optimalisering av tettheten av fuglene og næringsstofftilgangen, samt å unngå at patogene organismer fortsatt er tilstede etter en behandling. Disse tiltakene er utilstrekkelige og kan alene ikke hindre en infeksjon og sykdom.

Vaksiner mot histomoniasis er ikke tilgjengelige. For eksempel er en vaksinasjon mot *Histomonas meleagridis* biologisk sett ikke mulig, siden en naturlig immunitet heller ikke kan erverves etter en infeksjon. Dyr som en gang har blitt infisert kan bli syke på ny. Forsøk med svekket, levende antigen for immunisering var

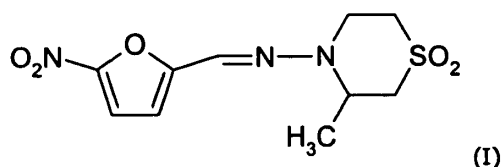
Det foreligger følgelig et behov for virksomme stoffer for behandling av sykdommer som skyldes Trichomonadida, f.eks. histomoniasis, med god virkning og gode toksikologiske egenskaper.

Overraskende nok har vi nå påvist aktivitet av nifurtimox mot Trichomonadida, hvor nifurtimox også viser gode toksikologiske egenskaper. Denne aktiviteten har ikke blitt beskrevet tidligere, og de gode toksikologiske egenskapene var heller ikke forventede.

Oppfinnelsen gjelder:

Anvendelse av nifurtimox for fremstilling av legemidler for behandling av sykdommer som skyldes Trichomonadida.

Nifurtimox er forbindelsen med formel (I):



Eventuelt kommer også benyttelse i form av vanlige, farmasøytisk akseptable salter på tale. Videre kommer eventuelt også benyttelse av hydrater eller andre solvater av de virksomme stoffer eller eventuelt salter av disse på tale.

Anvendelsen kan være både forebyggende og terapeutisk. Til Trichomonadida regnes slektene *Histomonas*, *Trichomonas*, *Tritrichomonas*. Fra slekten *Trichomonas* kan spesielt nevnes *T. gallinae* og *T. gallinarum*. Fra slekten *Tritrichomonas* kan spesielt nevnes *T. foetus*, *T. suis* og *T. equii*. Fra slekten *Histomonas* kan spesielt nevnes *H. meleagridis*.

Til Dipomonadida regnes slekten *Hexamita*. Fra slekten *Hexamita* kan spesielt nevnes *H. columbae*, *H. meleagridis* og *H. salmonis*.

Bekjempelse av histomoniasis foretrekkes. Histomoniasis forårsakes av *Histomonas* spp. Ganske spesielt foretrekkes bekjempelse ifølge oppfinnelsen av histomoniasis forårsaket av *Histomonas meleagridis*. Aktiviteten av nifurtimox ved bekjempelse av histomoniasis er ikke bare rettet mot stadier i tarmen av den patogene organismen, men også mot leverstadier av organismen.

Ifølge oppfinnelsen behandles dyr. Som eksempler kan nevnes pattedyr, f.eks. storfe, hest, gris, hund og katt. Fortrinnsvis behandles fjærkre, f.eks. høns, perlehøns,

rapphøns, vaktler, ender, gjess, påfugl, fasan, duer og spesielt kalkunhøns (som her er synonymt med kalkunhane).

Eksempelvis fremheves følgende sykdommer:

5 Trikomonose hos due, kalkun eller høns forårsaket av *T. gallinarum* og/eller *T. gallinae*.

Histomoniasis hos høns, perlehøns, påfugl, fasaner, rapphøns, vaktel og spesielt hos kalkun. Histomoniasis hos kalkun (smittsom leverblindtarmsbetennelse (blackhead)) forårsakes særlig av *H. meleagridis*.

10 Anvendelsen av de virksomme stoffene skjer direkte eller i form av egnede tilberedninger, enteralt, parenteralt eller dermalt.

Enteral anvendelse av de virksomme stoffene skjer f.eks. oralt i form av pulvere, stikkpiller, tabletter, kapsler, grøter, drikker, granulater, store doser, boli, fôr eller drikkevann tilsatt medisin. Dermal anvendelse skjer f.eks. i form av dypping, påsprøyting (spraying), bad, vask, påhelling (pour-on and spot-on) og pudring.

15 Parenteral anvendelse skjer f.eks. i form av injeksjon (intramuskulær, subkutan, intravenøs, intraperitoneal) eller ved hjelp av implantater.

Egnede preparater er:

Løsninger, som injeksjonsløsninger, orale løsninger, konsentrater for oral tilførsel etter fortykning, løsninger for bruk på huden eller i kroppshulrom, 20 infusjonsutforminger, geler,

emulsjoner og suspensjoner for oral eller dermal anvendelse samt for injeksjon, halvfaste tilberedninger,

utforminger hvor den aktive forbindelse er innarbeidet i en salvebasis eller i en olje-i-vann- eller vann-i-olje-emulsjonsbasis,

25 faste preparater som pulvere, ferdigblandinger eller konsentrater, granulater, pelleter, tabletter, boli, kapsler, aerosoler og inhaleringsmidler, formede legemer som inneholder aktiv forbindelse.

Injeksjonsløsninger tilføres f.eks. intravenøst, intramuskulært eller subkutan.

30 Orale løsninger anvendes direkte. Konsentrater anvendes oralt etter foregående fortykning til anvendelseskonsentrasjonen.

Løsninger for bruk på huden dryppes på, strykes på, gnis inn, sprøytes på, dusjes på eller påføres ved dypping, bad eller vask.

Geler smøres eller strykes på huden eller føres inn i hulrom i kroppen.

35 Utforminger for påhelling helles eller sprøytes på et begrenset område av huden, hvorved den aktive forbindelse enten trenger gjennom huden og virker systemisk eller fordeler seg på kroppsoverflaten.

Emulsjoner er enten av type vann-i-olje eller olje-i-vann og kan anvendes oralt, dermalt eller som injeksjoner.

Suspensjoner kan anvendes oralt, dermalt eller som injeksjoner.

Halvfaste preparater kan tilføres oralt eller dermalt. De skiller seg kun fra de ovenfor beskrevne suspensjoner og emulsjoner ved sin høyere viskositet.

For fremstilling av faste preparater blandes de aktive forbindelsene med egnede bærestoffer, eventuelt med tilsetning av hjelpestoffer, og bringes over i den  
5 ønskede form.

Spesielt foretrukket ifølge oppfinnelsen er anvendelse på fugl. Anvendelsen skjer fortrinnsvis oralt, særlig via medisineret fôr eller via drikkevannet.

Alle de ovenfor nevnte legemiddelformene, tilsetningsstoffene og hjelpestoffene som skal anvendes og fremstillingen av disse legemiddelformene er i  
10 prinsippet kjent.

De aktive forbindelsene kan foreligge i kombinasjon med synergistiske forbindelser eller med andre aktive forbindelser. Som andre aktive forbindelser kan nevnes:

Koksidostatiske midler som robenidin eller amprolium, til dels i kombinasjon  
15 med folsyreantagonister (f.eks. etopabat, pyrimetamin, epiroprom),  
polyeter-antibiotika som monensin, salinomycin, lasalocid, narasin, semduramicin eller maduramicin,

triazinoner som toltrazuril, ponazuril eller diklazuril,  
sulfonamider (sulfakvinoksalin, sulfadimidin, sulfadiazin),

20 For en langvarig behandlingsevne anbefales det å desinfisere dyrebstanden før innstillingen eller etter avsluttet fetningsperiode.

Helminter, særlig *Heterakis spp.* (larver) (9) fungerer som transportbærere ved overføring av histomonader. Ved behandling av histomoniasis kan det følgelig være fornuftig med en kombinasjonsbehandling med anthelmintika. Således er det kjent at  
25 anthelmintika, f.eks. benzimidazolene albendazol eller fenbendazol er profylaktisk aktive *in vivo* dersom behandlingen skjer fra infeksjonens begynnelse. Det vanlige er anthelmintisk behandling over 14 dager fra infeksjonstidspunktet. Ved en kombinert behandling med nifurtimox og anthelmintika kan det følgelig oppnås en forbedret behandling av sykdommer som skyldes trikomonader.

30 Som anthelmintika kan benzimidazoler som albendazol, fenbendazol eller probenzimidazoler som febantel nevnes. Disse forbindelsene er f.eks. aktive mot *Heterakis spp.*, særlig mot *Heterakis gallinarum*, som vites å fungere som transportvektor for *Histomonas meleagridis*.

Videre kan nevnes imidazoltiazoler (levamizol, tetramizol), tetrahydro-  
35 pyrimidiner (pyrantel, morantel, oksantel), amidinderivater, f.eks. amidantel, tribendimidin samt det deacylerte amidantel-derivat Bay d 9216 og aminoacetonitril-derivater (se f.eks. Kaminsky et al., *Nature* 452, 176-180 (13. mars 2008), f.eks. AAD 1470).

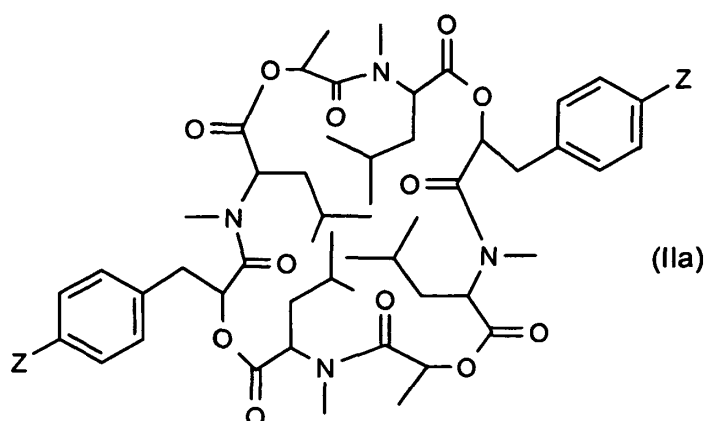
Som foretrukne anthelmintika kan depsipeptid-anthelmintika nevnes.

Depsipeptid-anthelmintika som PF1022A og emodepsid har en bred anthelmintisk aktivitet mot nematoder i forskjellige dyrearter, som hønsefugl, gnagere, reptiler, hund, katt, sau, storfe, geit, hest (11, 12, 13, 14). Her kunne det vises at PF1022A og emodepsid er aktive mot nematoder fra overfamilien Heterakoidea. Til disse hører blant annet fra familien Heterakidae, i tillegg til *Heterakis gallinarum* i høns, muse-nematoden *Heterakis spumosa*. Mot sistnevnte er PD1022A f.eks. aktiv ved en oral dose på 50 mg/kg samt emodepsid f.eks. i doseområdet fra 1-10 mg/kg (13, 15). Videre er f.eks. PF1022A beviselig aktiv mot nok en representant fra overfamilien Heterakoidea, *Ascaridia galli* i høns, som tilhører familien Ascaridiidae. Her virker forbindelsen i en dose på 2 mg/kg. (16). Disse forbindelsene fra forbindelsesklassen av sykliske depsipeptider egner seg følgelig for profylaktisk bekjempelse, særlig av histomoniasis.

Depsipeptid-anthelmintika som foretrekkes anvendt er syklodepsipeptider med

24 medlemmer. Av disse kan nevnes:

Forbindelser med formel (IIa)

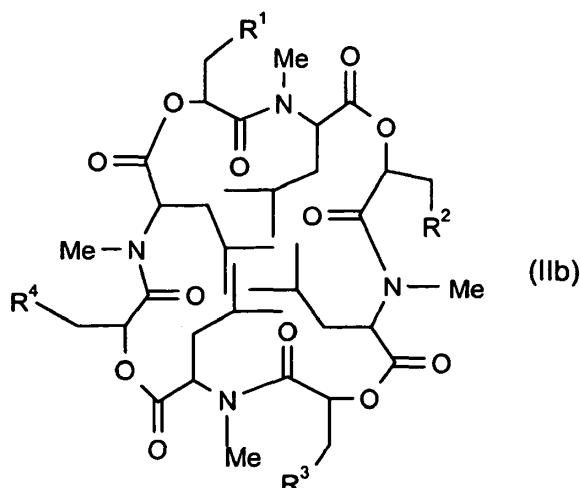


hvor

Z står for hydrogen, N-morfolinyl, NH<sub>2</sub>, mono- eller dimetylamino.

I tillegg kan forbindelser med formel (IIb) nedenfor nevnes:



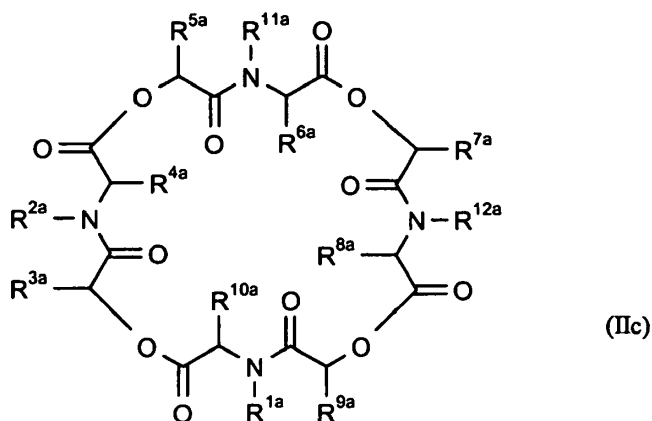


hvor

$R^1, R^2, R^3, R^4$  uavhengig av hverandre står for hydrogen,  $C_1$ - $C_{10}$ -alkyl eller aryl, fortrinnsvis fenyl, som om ønskelig er substituert med hydrokso,  $C_1$ - $C_{10}$ -alkokso eller halogen.

Forbindelsene med den generelle formelen (IIb) er kjente og kan erholdes ifølge fremgangsmåtene som beskrives i 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.

Til de sykliske depsipeptidene med 24 atomer i ringen regnes også forbindelser med den generelle formel (IIc)



hvor

$R^{1a}, R^{2a}, R^{11a}$  og  $R^{12a}$  uavhengig av hverandre står for  $C_{1-8}$ -alkyl,  $C_{1-8}$ -halogenalkyl,  $C_3$ - $C_6$ -sykloalkyl, aralkyl, aryl.

$R^{3a}, R^{5a}, R^{7a}, R^{9a}$  uavhengig av hverandre står for hydrogen eller uforgrenet eller forgrenet  $C_{1-8}$ -alkyl som om ønskelig kan være substituert med hydrokso,  $C_{1-4}$ -alkokso,

karboksy, ( $\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}\text{OH}$ ), karboksamid, ( $\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}\text{NH}_2$ ), imidazolyl, indolyl, guanidino, -SH eller  $\text{C}_{1-4}$ -alkyltio, og videre for aryl eller aralkyl som kan være substituert med halogen, hydroksy,  $\text{C}_{1-4}$ -alkyl,  $\text{C}_{1-4}$ -alkoksy,  $\text{R}^{4a}$ ,  $\text{R}^{6a}$ ,  $\text{R}^{8a}$ ,  $\text{R}^{10a}$  uavhengig av hverandre står for hydrogen, uforgrenet  $\text{C}_{1-5}$ -alkyl,  $\text{C}_2$ -6-alkenyl,  $\text{C}_{3-7}$ -sykloalkyl som om ønskelig kan være substituert med hydroksy,  $\text{C}_{1-4}$ -alkoksy, karboksy, karboksamid, imidazolyl, indolyl, guanidino, SH eller  $\text{C}_{1-4}$ -alkyltio, samt for aryl eller aralkyl som kan være substituert med halogen, hydroksy,  $\text{C}_{1-4}$ -alkyl,  $\text{C}_{1-4}$ -alkoksy, samt deres optiske isomerer og racemater.

Foretrukne forbindelser med formel (IIc) er forbindelser i hvilke  $\text{R}^{1a}$ ,  $\text{R}^{2a}$ ,  $\text{R}^{11a}$  og  $\text{R}^{12a}$  uavhengig av hverandre står for metyl, etyl, propyl, isopropyl, n-, s-, t-butyl eller fenyl som om ønskelig er substituert med halogen,  $\text{C}_{1-4}$ -alkyl, OH,  $\text{C}_{1-4}$ -alkoksy, samt for benzyl eller fenyletyl som om ønskelig kan være substituert med de samme rester som er angitt for fenyl,

$\text{R}^{3a}$  til  $\text{R}^{10a}$  har betydningen som er angitt ovenfor.

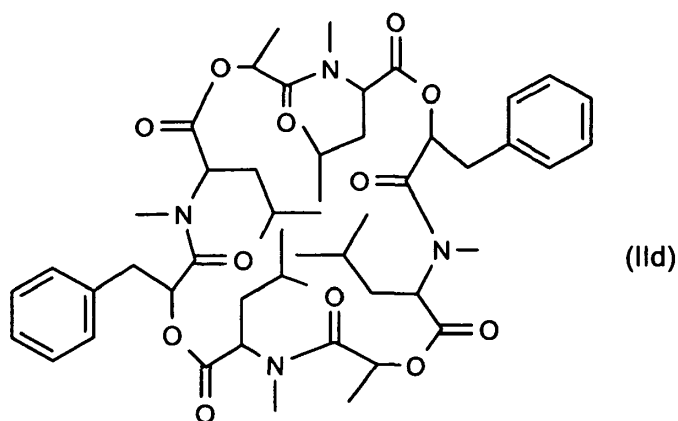
Spesielt foretrukne forbindelser med formel (IIc) er forbindelser hvori  $\text{R}^{1a}$ ,  $\text{R}^{2a}$ ,  $\text{R}^{11a}$  og  $\text{R}^{12a}$  uavhengig av hverandre står for metyl, etyl, propyl, isopropyl eller n-, s-, t-butyl,

$\text{R}^{3a}$ ,  $\text{R}^{5a}$ ,  $\text{R}^{7a}$ ,  $\text{R}^{9a}$  står for hydrogen, uforgrenet eller forgrenet  $\text{C}_{1-8}$ -alkyl, fortrinnsvis metyl, etyl, propyl, isopropyl, n-, s-, t-butyl, som om ønskelig kan være substituert med  $\text{C}_{1-4}$ -alkoksy, fortrinnsvis metoksy, etoksy, imidazolyl, indolyl eller  $\text{C}_{1-4}$ -alkyltio, fortrinnsvis metyltio, etyltio, videre for fenyl, benzyl eller fenetyl som om ønskelig kan være substituert med halogen, fortrinnsvis klor.

$\text{R}^{4a}$ ,  $\text{R}^{6a}$ ,  $\text{R}^{8a}$ ,  $\text{R}^{10a}$  uavhengig av hverandre står for hydrogen, metyl, etyl, n-propyl, n-butyl, vinyl, sykloheksyl, som om ønskelig kan være substituert med metoksy, etoksy, imidazolyl, indolyl, metyltio, etyltio, samt for isopropyl, s-butyl, videre for eventuelt halogensubstituert fenyl, benzyl eller fenyletyl.

Forbindelsene med formel (IIc) kan likeså fremstilles ifølge fremgangsmåtene som er beskrevet i 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.

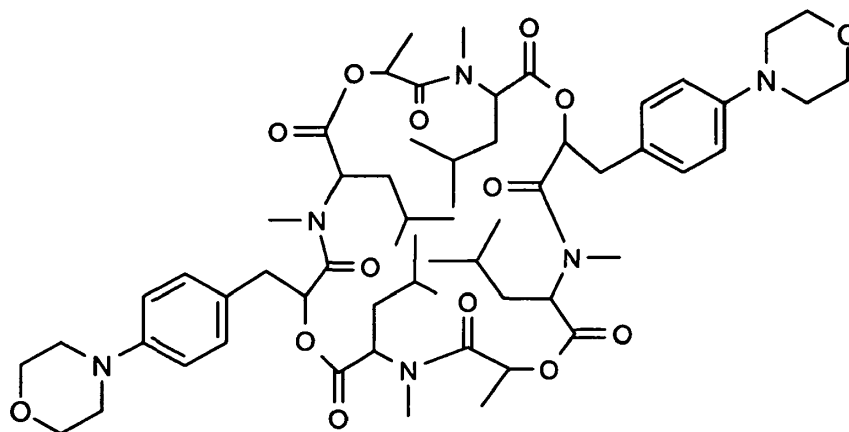
Som et spesielt foretrukket depsipeptid kan nevnes forbindelsen PF 1022, som er kjent fra EP-OS 382 173, det dreier seg om forbindelsen med formel (IIa) hvori begge substituentene Z står for hydrogen. PF 1022 har altså formel (IId) nedenfor:



Videre foretrukne depsipeptider er forbindelser som er kjent fra PCT-patentsøknaden WO 93/19053, nemlig forbindelser med formel (IIa),  
hvor

5 Z står for N-morfolinyl, NH<sub>2</sub>, mono- eller dimetylamino.

Av disse forbindelsene foretrekkes helt spesielt depsipeptidet emodepsid (PF 1022-221). Det dreier seg om forbindelsen med formel (IIa) hvor begge restene Z står for morfolinyl. Det internasjonale, uregistrerte navnet emodepsid står for forbindelsen med det systematiske navnet: syklo[(*R*)-laktolyl-*N*-metyl-L-leucyl-(*R*)-3-(*p*-  
10 morfolinofenyl)laktolyl-*N*-metyl-L-leucyl-(*R*)-laktolyl-*N*-metyl-L-leucyl-(*R*)-3-(*p*-morfolinofenyl)laktolyl-*N*-metyl-L-leucyl. Emodepsid er beskrevet i WO 93/19053 og har følgende formel:



15

De aktive forbindelsene som er nevnt ovenfor for kombinasjon kan alt ut fra strukturen foreligge i stereoisomere former eller som blandinger av stereoisomerer, f.eks. som enantiomerer eller racemater. Både blandinger av stereoisomerer og de rene stereoisomerene kan anvendes ifølge oppfinnelsen.

20 Videre kan det om ønskelig også anvendes salter av de aktive forbindelser med farmasøytisk anvendelige syrer eller baser, og også solvater, fortrinnsvis hydrater, av de aktive forbindelsene eller deres salter.

Anvendelse i kombinasjon betyr enten at nifurtimox og den andre aktive forbindelsen, fortrinnsvis et syklodepsipeptid, kan anvendes separat eller forskjøvet i tid. I dette tilfelle er nifurtimox og den andre aktive forbindelsen utformet som separate legemidler.

5 Samtidig anvendelse er også tenkelig. Ifølge en utførelse som er egnet for dette tilfellet er de to aktive forbindelsene i kombinasjonen utformet sammen til ett middel.

Bruksklare preparater inneholder vanligvis den angjeldende aktive forbindelse i en konsentrasjon fra 10 ppm til 20 % (vekt/vekt), fortrinnsvis fra 0,1 til 10 % (vekt/vekt).

10 Preparater som fortynnes før bruk inneholder den angjeldende aktive forbindelse i en konsentrasjon fra 0,5 til 90 % (vekt/vekt), fortrinnsvis fra 5 til 50 % (vekt/vekt). I konsentrerte løsninger for inndosering i drikkevann foreligger den angjeldende aktive forbindelse for eksempel i en konsentrasjon fra 0,5 til 20 % (vekt/vekt), fortrinnsvis fra 1 til 15 % (vekt/vekt), spesielt foretrukket fra 2 til 10 %  
15 (vekt/vekt).

Generelt har det for å oppnå gode resultater vist seg fordelaktig å tilføre mengder fra tilnærmet 0,05 til tilnærmet 200 mg, fortrinnsvis 0,1 til 100 mg, aktiv forbindelse pr. kg kroppsvekt pr. dag.

I blandingen med andre koksidiøse-midler eller polyeter-antibiotika foreligger  
20 de aktive forbindelsene ifølge oppfinnelsen som regel i et vektforhold fra 1 til 0,01 – 50 til 1 til 50.

De aktive forbindelsene kan også tilføres til dyrene sammen med fôr eller drikkevann.

Fôr- og næringsmidler inneholder fra 0,005 til 1000 ppm, fortrinnsvis fra 0,05 til  
25 500 ppm av den aktive forbindelsen i kombinasjon med et egnet, spiselig materiale.

Et slik fôr- og næringsmiddel kan anvendes både for helbredende og forebyggende formål.

Fremstillingen av et slik fôr- eller næringsmiddel skjer ved å blande et konsentrat eller en forblending som inneholder 0,5 til 30 %, fortrinnsvis 1 til 20 %  
30 (vekt)vekt) av en aktiv forbindelse blandet med et spiselig organisk eller uorganisk bærestoff, med vanlige fôrmidler. Spiselige bærestoffer er f.eks. maismel eller mais- og soyabønnemel eller mineralsalter som fortrinnsvis inneholder en liten mengde av en spiselig, støvforebyggende olje, f.eks. maisolje eller soyaolje. Forblendingen som erholdes på denne måten kan så tilsettes til det fullstendige fôrmiddelet før dette  
35 tilføres til dyrene.

Som et eksempel beskrives benyttelsen ved histomoniasis:

For helbredelse eller forebyggelse av histomoniasis hos fjærkre, fortrinnsvis høns, ender, gjess eller kalkun, blandes 0,005 til 1000 ppm, fortrinnsvis 0,05 til 500 ppm av en aktiv forbindelse med et egnet, spiselig materiale, f.eks. et næringsholdig

fôrmiddel. Om ønskelig kan denne mengden økes, særlig når den aktive forbindelsen tåles godt av mottakeren. På tilsvarende måte kan tilførselen skje via drikkevannet.

Trass i dette kan det til tider være nødvendig å avvike fra de nevnte mengder, særlig avhengig av forsøksdyrets kroppsvekt eller typen av tilførselsfremgangsmåte, men også avhengig av dyrearten og dennes individuelle reaksjon på den aktive forbindelsen eller utformingsmåten og tidspunktet eller tidsintervallet som tilførselen skjer ved. Således kan det i visse tilfeller være tilstrekkelig med mindre enn den ovenfor nevnte minstemengde, mens man i andre tilfeller må overskride den nevnte øvre grense. Ved tilførsel av større mengder kan det være hensiktsmessig å dele disse opp i flere enkelttilførsler i løpet av dagen.

Aktiviteten av forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan f.eks. vises i burforsøk med følgende forsøksoppsett, hvor dyrene behandles med den angjeldende aktive forbindelse.

Et fôr som inneholder aktiv forbindelse tilberedes slik at den nødvendige mengde aktiv forbindelse er grundig sammenblandet med et næringsmessig balansert dyrefôr, f.eks. med det nedenfor angitte kyllingfôr.

Dersom det skal fremstilles et konsentrat eller en forblanding som så skal fortynnes i fôret til de verdier som er nevnt i forsøket, blandes vanligvis fra tilnærmet 1 til 30 %, fortrinnsvis fra tilnærmet 10 til 20 % (vekt/vekt) av den aktive forbindelse med et spiselig organisk eller uorganisk bærestoff, f.eks. mais- og soyamel eller mineralsalter som inneholder en liten mengde av en spiselig, støvforebyggende olje, f.eks. maisolje eller soyabønneolje. Forblandingen som erholdes på denne måten kan så tilsettes til det fullstendige fjærfefôret før fôringen.

Som eksempel for anvendelsen av stoffene ifølge oppfinnelsen i fjærfefôr kan følgende sammensetning nevnes:

|         |                                                  |
|---------|--------------------------------------------------|
| 52,00 % | grov malt fôrkorn, nemlig: 40 % mais, 12 % hvete |
| 17,00 % | soyakorn ekstr.                                  |
| 5,00 %  | maisstivelsefôr                                  |
| 5,00 %  | hvetefôrmel                                      |
| 3,00 %  | fiskemel                                         |
| 3,00 %  | mineralstoffblanding                             |
| 3,00 %  | Lucerne-gressmel                                 |
| 2,50 %  | vitaminblanding                                  |
| 2,00 %  | knust hvetekim                                   |
| 2,00 %  | soyaolje                                         |
| 2,00 %  | benmel                                           |

|          |                           |
|----------|---------------------------|
| 1,50 %   | mysepulver                |
| 1,00 %   | melasse                   |
| 1,00 %   | ølgjær, bundet til ølmalt |
| <hr/>    |                           |
| 100,00 % |                           |

Et slik fôr inneholder 18 % råprotein, 5 % råfiber, 1 % Ca, 0,7 % P samt pr. kg 1200 IE vitamin A, 1200 IE vitamin D3, 10 mg vitamin E, 20 mg sinkbacitracin.

### **Litteratur:**

- 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  
10        protozoa: Giardia, Trichomonas and Entamoeba - current level of knowledge and outlook.
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  
15        protozoa: Kinetoplastida - current level of knowledge and outlook. *Parasitol Res* 87:778-780.
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  
20        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
9. Hegngi F.N., Doerr J., Cummings T.S., Schwartz R.D., Saunders G., Zajac A.,  
25        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  
30        derivatives for the treatment and prevention of histomonosis (blackhead) in turkeys. *Veterinary Parasitology* 81:29-37.

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):  
5 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
13. Harder A., Schmitt-Wrede H.-P., Krücken J., Marinovski P., Wunderlich F.,  
Willson J., Amliwala K., Holden-Dye L., Walker R. (2003):  
10 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 Suppl 1 : S65-S69
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  
20 anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A. Journal of Antibiotics 45 : 692-697

## **Eksempler**

### **Fôr tilsatt medikament**

- Fôr tilsatt medikament kan fremstilles ved å blande nifurtimox på pulverform
- 25 med den nedenfor angitte fôrblendingen i konsentrasjoner på 50, 100, 200 og 400 ppm.
- |         |                                                   |
|---------|---------------------------------------------------|
| 52,00 % | grov malt fôr Korn, nemlig: 40 % mais, 12 % hvete |
| 17,00 % | soyakorn ekstr.                                   |
| 5,00 %  | maisstivelsefôr                                   |
| 5,00 %  | hvetefôr mel                                      |
| 3,00 %  | fiskemel                                          |
| 3,00 %  | mineralstoffblanding                              |
| 3,00 %  | Lucerne-gressmel                                  |
| 2,50 %  | vitaminblanding                                   |
| 2,00 %  | knust hvetekim                                    |
| 2,00 %  | soyaolje                                          |
| 2,00 %  | benmel                                            |

|          |                           |
|----------|---------------------------|
| 1,50 %   | mysepulver                |
| 1,00 %   | melasse                   |
| 1,00 %   | ølgjær, bundet til ølmalt |
| <hr/>    |                           |
| 100,00 % |                           |

### Tabletter

Nifurtimox-tabletter er kjent og kan f.eks. erholdes som legemiddel under varemerket "Lampit".

### 5 **A. Biologisk eksempel: Burforsøk med histomonade-aktivitet i kalkun**

Histomonade-frie, 10 dager gamle kalkunhaner tilføres fra dag -4 (= 4 dager før infeksjonen) til dag 14 nifurtimox eller sammenligningsforbindelsen nitarson i konsentrasjonen som er angitt i "ppm" i fôret. Infeksjonen skjer på dag 0. I hvert gruppebur ble det oppstallet 10 dyr. Hver dose ble tilført til 1 til 3 slike grupper.

10 Infeksjonen skjer med en histomonade-feltstamme som dyrkes i laboratoriet og lagres i flytende nitrogen. På dag 0 infiseres 5 dyr pr. bur (bortsett fra de ikke-infiserte kontrolldyrene) intrakloakalt med 250000 histomonader i 1 ml Dwyers medium (= direkte infeksjon). Disse infiserte dyrene skiller etter få dager ut nye histomonader og overfører derved den patogene organismen til de resterende 5 dyrene i buret (=

15 indirekte infeksjon).

For vurdering av aktiviteten benyttes kriteriene ifølge Mc Dougald og Hu 2001 (7):

- den infeksjonsavhengige dødelighet
- vektøkningen fra forsøkets begynnelse til avslutningen
- 20 - fôropptak
- fôrutnyttelse
- makroskopisk vurdering av infeksjonsavhengige lesjoner i blindtarm (caecum) og lever. I denne vurderingen betyr "0 poeng" = ingen lesjoner og "4 poeng" = omfattende lesjoner.

25

**Tabell 1: Forsøksoppsett 210 dyr**

| Gruppe      | Kode | Behandling  |               |            | Infeksjon |
|-------------|------|-------------|---------------|------------|-----------|
|             |      | Forbindelse | Konsentrasjon | Dag        |           |
| Ikke inf.   | D    | ubehandlet  | -             | -          | -         |
| Inf. kontr. | F    | ubehandlet  | -             | -          | +         |
| 30 ppm      | E    | Nifurtimox  | 30 ppm        | -4 til +14 | +         |



| Gruppe  | Kode | Behandling  |               |            | Infeksjon |
|---------|------|-------------|---------------|------------|-----------|
|         |      | Forbindelse | Konsentrasjon | Dag        |           |
| 60 ppm  | B    | Nifurtimox  | 60 ppm        | -4 til +14 | +         |
| 120 ppm | C    | Nifurtimox  | 120 ppm       | -4 til +14 | +         |
| 200 ppm | G    | Nifurtimox  | 200 ppm       | -4 til +14 | +         |
| Nita.   | A    | Nitarson    | 187,5 ppm     | -4 til +14 | +         |

**Tabell 2: Forsøksoppsett 210 dyr**

| Gruppe      | Kode | Behandling  |               |            | Infeksjon |
|-------------|------|-------------|---------------|------------|-----------|
|             |      | Forbindelse | Konsentrasjon | Dag        |           |
| Ikke inf.   | G    | ubehandlet  | -             | -          | -         |
| Inf. kontr. | A    | ubehandlet  | -             | -          | +         |
| 100 ppm     | D    | Nifurtimox  | 100 ppm       | -4 til +14 | +         |
| 200 ppm     | F    | Nifurtimox  | 200 ppm       | -4 til +14 | +         |
| 300 ppm     | B    | Nifurtimox  | 300 ppm       | -4 til +14 | +         |
| 400 ppm     | C    | Nifurtimox  | 400 ppm       | -4 til +14 | +         |
| Nita.       | E    | Nitarson    | 187.5 ppm     | -4 til +14 | +         |

**Tabell 3: Dødelighet grunnet histomoniasis**

| Behandling  | Dødelighet | Behandling  | Dødelighet |
|-------------|------------|-------------|------------|
| inf. kontr. | 7          | inf. kontr. | 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          |

**Tabell 4: Gjennomsnittlig vektøkning (g) fra dag 0 til dødstidspunktet**

| Behandling  | Direkte infeksjon |     | Behandling  | Direkte infeksjon |     |
|-------------|-------------------|-----|-------------|-------------------|-----|
|             | nei               | ja  |             | nei               | ja  |
| Ikke inf.   | 791               |     | ikke inf.   | 819               |     |
| Inf. kontr. | 741               | 197 | inf. kontr. | 666               | 259 |
| 30 ppm      | 730               | 235 | 100 ppm     | 581               | 135 |
| 60 ppm      | 838               | 304 | 200 ppm     | 525               | 270 |
| 120 ppm     | 744               | 182 | 300 ppm     | 750               | 450 |
| 200 ppm     | 744               | 264 | 400 ppm     | 832               | 691 |
| Nita.       | 782               | 541 | Nita.       | 725               | 426 |

**Tabell 5: Gjennomsnittlig fôrforbruk mellom dag 0 og dag 14**

| Behandling         | Fôrforbruk (kg) | Behandling         | Fôrforbruk (kg) |
|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| Ikke inf, kontroll | 12,01           | Ikke inf, kontroll | 12,44           |
| Infisert kontroll  | 8,84            | Infisert kontroll  | 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 Tabell 6: Gjennomsnittlig fôrutnyttelse mellom dag 0 og dag 14**

| Behandling         | Fôrutnyttelse | Behandling         | Fôrutnyttelse |
|--------------------|---------------|--------------------|---------------|
| Ikke inf, kontroll | 1,52          | Ikke inf, kontroll | 1,63          |
| Infisert kontroll  | 1,89          | Infisert kontroll  | 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          |

**Tabell 7: Gjennomsnittlig omfang av lesjoner i blindtarm**

| Behandling         | Direkte infeksjon |      | Behandling         | Direkte infeksjon |      |
|--------------------|-------------------|------|--------------------|-------------------|------|
|                    | nei               | ja   |                    | nei               | ja   |
| Ikke inf, kontroll | 0,03              |      | Ikke inf, kontroll | 0,00              |      |
| Inf, kontroll      | 0,29              | 3,93 | Inf, kontroll      | 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 |

**Tabell 8: Infeksjonsavhengige lesjoner i lever**

| Behandling  | Direkte infeksjon |      | Behandling  | Direkte infeksjon |      |
|-------------|-------------------|------|-------------|-------------------|------|
|             | nei               | ja   |             | nei               | ja   |
| Ikke inf,,  | 0,00              |      | Ikke inf,,  | 0,00              |      |
| Inf, kontr, | 0,29              | 3,47 | Inf, kontr, | 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 |

5 **B. Biologisk eksempel: Sykliske oktadepsipeptiders anthelmintiske egenskaper**

Hanmus (stamme Bor CFW, kroppsvekt mellom 25 og 30 g) holdes i makrolon-bur (3 dyr/bur) og forsynes ad libitum med vann og SNIFF rottefôr (1 mm pelleter). Musene infiseres med *Heterakis spumosa* ved oral tilføres av 90 embryoholdige egg. Eggene ble erholdt fra hunormer som ble isolert fra musekolon 40 dager etter infeksjon. Eggene ble inkubert videre i 3 uker ved 37 °C. 35 dager etter infeksjonen behandles musene med den angjeldende dose av PF1022A eller emodepsid på fire på hverandre følgende dager. PF1022A suspenderes i Cremophor EL. Musene avlives på dag 7 etter behandlingen, og tynntarm-blindtarm-kolon-området tas ut og ormene telles makroskopisk. Forholdet mellom antall erholdte orm i prosent av det

10

totale antall ormer i ubehandlede, infiserte kontrolldyr defineres som mål for den anthelmintiske aktiviteten.

Eksperimentene på høns beskrives i (14) og litteraturen som siteres deri.

5 **Tabell 9: Anthelmintisk aktivitet av PF1022A og emodepsid mot nematoder fra overfamilien Heterakoidea**

| Nematode                       | Dose med full aktivitet |
|--------------------------------|-------------------------|
| PF1022A                        |                         |
| <i>Heterakis spumosa</i> (mus) | 50 mg/kg                |
| <i>Ascaridia galli</i> (høns)  | 2 mg/kg                 |
| Emodepsid                      |                         |
| <i>Heterakis spumosa</i> (mus) | 1-10 mg/kg              |

P a t e n t k r a v

1.       Anvendelse av nifurtimox for fremstilling av legemidler for behandling av sykdommer som forårsakes av Trichomonadida.

5

2.       Anvendelse ifølge krav 1 for behandling av sykdommer som forårsakes av histomonader.

3.       Anvendelse ifølge krav 2 for behandling av sykdommer som forårsakes av *Histomonas meleagridis*.

10

4.       Anvendelse ifølge krav 1 for behandling av sykdommer som forårsakes av trikomonader.

5.       Anvendelse ifølge krav 1 for behandling av sykdommer som forårsakes av tritrikomonader.

15

6.       Nifurtimox for anvendelse for behandling av sykdommer som forårsakes av Trichomonadida.

20

7.       Nifurtimox for anvendelse ifølge krav 6 for behandling av sykdommer som forårsakes av histomonader.

8.       Nifurtimox for anvendelse ifølge krav 6 for behandling av sykdommer som forårsakes av *Histomonas meleagridis*.

25

9.       Nifurtimox for anvendelse ifølge krav 6 for behandling av sykdommer som forårsakes av trikomonader.

10.      Nifurtimox for anvendelse ifølge krav 6 for behandling av sykdommer som forårsakes av tritrikomonader.

30

11.      Nifurtimox for anvendelse ifølge ethvert av kravene 6 til 10 på fjærkre.

12.      Nifurtimox for anvendelse ifølge krav 11 på kalkun.

35