



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2310018 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 31/541 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 38/15 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.04.22
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.12.18
(86)	Europeisk søknadsnr	09772099.9
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.06.20
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.04.20
(30)	Prioritet	2008.07.02, DE, 102008031284
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Bayer Intellectual Property GmbH, Alfred-Nobel-Strasse 10, 40789 Monheim, DE-Tyskland
(72)	Oppfinner	GREIF, Gisela, Marienhöhe 15, 53424 Remagen, DE-Tyskland HARDER, Achim, Europaring 54, 51109 Köln, DE-Tyskland BACH, Thomas, Berghauserstrasse 18, 42349 Wuppertal, DE-Tyskland PETRY, Gabriele, Maybachstrasse 15, 47809 Krefeld, DE-Tyskland KRUEDEWAGEN, Eva-Maria, Opladener Strasse 117, 40789 Monheim, DE-Tyskland
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	ANVENDELSE AV NIFURTIMOX FOR BEHANDLING AV GIARDIASIS
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A- 0 382 173 , US-A- 3 262 930 ESCOBEDO ANGEL A ET AL: "Giardiasis: a pharmacotherapy review." EXPERT OPINION ON PHARMACOTHERAPY AUG 2007, Bd. 8, Nr. 12, August 2007 (2007-08), Seiten 1885-1902, XP009123116 ISSN: 1744-7666 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 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 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 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 RYAN-GULLAHORN JEAN: "Giardia and effective cattey management for the veterinarian" FELINE PRACTICE, Bd. 28, Nr. 2, März 2000 (2000-03), Seiten 8-9, XP009123223 ISSN: 1057-6614

Beskrivelse

[0001] Foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelsen av nifurtimox for behandling av giardiasis, særlig hos hund og katt.

[0002] Virkningen av nitroheterocykliske forbindelser mot protozo-sykdommer er kjent (1).

[0003] Til protozoene regnes mononukleære organismer hvis grunnstruktur er en eukaryot celle. I den nøyaktige systematikken finnes derimot store forskjeller i levemåte, morfologi og det biokjemiske stoffskiftet for de enkelte stammer, klasser, slekter og arter. Derfor virker kjemiske substanser alt etter sitt angrepspunkt og virkeprinsipp vanligvis ikke på samme måte mot alle protozoer, men bare mot spesielle grupper av protozoer (2,3,4).

[0004] Hittil er virkningen av nifurtimox bare beskrevet mot protozo-arter fra slekten trypanosoma, f.eks. *Trypanosoma brucei* og *Trypanosoma cruzi* (5).

Trypanosomer oppviser flageller som har sitt utspring i basallegemet ("kinetosom") og i forbindelse med grunnlegemet danner en undulerende membran. Parasitter med disse morfologiske grunntypene hører innenfor protozo-systematikken til ordenen av kinetoplastidene. Trypanosomer formerer seg hovedsakelig i blodplasma og overføres av blodsugende artropoder. Disse patogene organismene forårsaker Chagas' sykdom ("Trypanosoniasis") hos mennesket. Nifurtimox er for tiden nesten den eneste forbindelsen som virker mot disse patogene organismene. Denne aktiviteten beror sannsynligvis på inhibisjonen av trypanotion reduktasen, et spesielt enzym fra trypanosomer. Dette enzymet mangler hos andre patogene protozoer.

[0005] I en parallelt innlevert patentsøknad beskriver vi virkningen av nifurtimox mot Trichomonadida.

[0006] Ved giardiasis dreier det seg om en infeksjonssykdom som forårsakes av flagellerte, mononukleære parasitter av slekten Giardia. Denne slekten hører til ordenen av Diplomonadida. Dens viktigste representant er *Giardia lamblia* (syn. *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis*). I hele verden er opptil 50 %, i Mellom-Europa 2-7 % av prøver av hund og katt positive. En infeksjon fører spesielt hos veldig unge dyr i 1. halvåret av livet til langvarig diaré og delvis blodig avføring forårsaket av en betennelse av duodenum og jejunum. Kroniske forløp av sykdommen kan føre til langvarig forsinket vekst (6).

[0007] For gardia-isolater er det beskrevet mer enn 7 genotyper (A-G). For mennesket er genotyp A + B infeksøs som igjen også kan forekomme i katt, hund, bever, sau, kalv, hest, gris og ape. Derfor anses sykdommen som "zoonose": Mennesket kan bli smittet av drikkevann forurensset av cyster fra hund og katt. Giardia-

infeksjoner hører over hele verden med til de infeksjonene som hyppigst forårsaker såkalte "waterborn outbreaks" hos mennesket (7).

[0008] Infeksjonen skjer som oftest med forurenset drikkevann eller infeksjons-
avføring ad oral vei via cysteformen. I tarmen kommer de såkalte trofozoittene ut av
cysten. En trofozoitt er 11-17 x 7-11 µm stor, inneholder to kjerner og 8 flageller
(flimmerhår). I motsetning til andre flagellerte parasittgrupper borer Giardia
trofozoitter seg ikke intracellulært inn i epitel. Trofozoitter har en sugekopp som de
kan forankre seg med på innsiden av tarmkanalen til mennesker, aper, griser, hunder
og katter. Der formerer de seg ved deling i to. Et massivt angrep blokkerer og
forandrer den resorberende tarmoverflaten og forårsaker tildels blodig diaré. I
blindtarmen dannes på ny cyster som med en prepatens av 5-16 dager etter første
infeksjon på ny utskilles i avføringen. Cyster kan skilles ut over et tidsrom på 4-5 uker
og forblir i flere uker infeksiose (8,9).

[0009] Morfologisk og biokjemisk er det store forskjeller til ordenen av
kinetoplastidene: Diplomonadider har 8 flageller og to kjerner, men det finnes ingen
mitokondrier og ingen golgikompleks, og i utviklingen er ingen intracellulære stadier
kjent. I motsetning til trypanosomer har overflateproteinene til Giardia ikke noe GPI-
anker (10).

[0010] Hos hund og katt anbefales for tiden en terapi med metronidazol (Clont[®],
Flagyl[®], Elyzol[®]) i en dosering av 12,5-22 mg/kg kroppsvekt 2 x daglig i 5 dager (11).
Metronidazol og andre 5-nitroimidazoler aktiviseres med enzymet pyruvat-ferredoxin-
oksidoreduktase til dannelsen av frie nitro-radikaler som deretter angriper det
parasitære DNA-stoffskiftet. Derfor egner seg også ipronidazoler (Ipropan[®], 126 mg/l
drikkevann i 7 dager) samt tinidazol (Fasigyn[®], 44 mg/kg KGW i 3 dager) for terapien
av giardiasis hos hunder (12,13).

[0011] Fra gruppen av benzimidazoler anbefales mebendazol, albendazol eller
fenbendazol (oralt i 3 dager). Benzimidazoler interfererer med polymerisasjonen til
mikrotubuliene ved at de binder seg til underenheten av β-tubulinet. Mikrotubuli er
viktige cytoskjelettelementer til parasitten som på spesiell måte stabiliserer sugeskiven
til trofozoittene.

[0012] I humanmedisinen anvendes også antibiotika (f.eks. paramomycin, 25-35
mg/kg/dag i tre doseringer i 7-10 dager), quinacrin og furazolidon (100 mg t.i.d. i 7
dager) eller nitazoxanid (500 mg b.i.d. i 3 dager) (14).

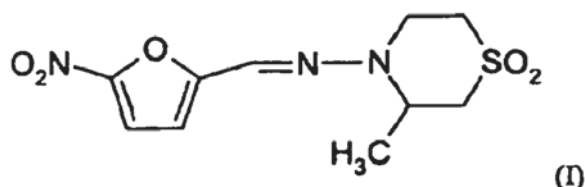
[0013] Mange av disse virkestoffklassene har i lang tid vært anvendt for behandling
av giardia-sykdommer og for de fleste kunne det dokumenteres en resistensutvikling
som fører til dokumenterte behandlingsnederlag. Derfor er utviklingen av nye
virkestoffer og behandlingskonsepter absolutt nødvendig (15).

[0014] Overraskende har vi nå funnet aktiviteten til nifurtimox mot Giardia. Denne aktiviteten er ikke beskrevet tidligere. Aktiviteten retter seg mot parasittstadiene i tarmen og forhindrer dannelsen av cyster.

[0015] Oppfinnelsen vedrører derfor:

[0016] Anvendelsen av nifurtimox for fremstilling av legemidler for behandling av sykdommer forårsaket av Giardia.

[0017] Nifurtimox er forbindelsen med formel (I):



[0018] Eventuelt kommer også anvendelsen i form av farmasøytisk akseptable salter på tale. I tillegg kommer eventuelt også anvendelsen av hydrater eller andre solvater av virkestoffene eller eventuelt deres salter på tale.

[0019] Anvendelsen kan skje både profylaktisk og terapeutisk. Aktiviteten retter seg mot forskjellige stadier til de patogene organismene, nifurtimox virker spesielt mot stadiene i tarmen og det forhindrer cystedannelsen.

[0020] Blant giardiene er av spesiell betydning *Giardia lamblia* (syn. *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis*), *Giardia bovis* og *Giardia caprae*. De her nevnte artene angis ofte som synonymer for hverandre og er lite vertsspesifikke.

[0021] Ifølge oppfinnelsen behandles dyr (kjøttetere og villdyr), fortrinnsvis pattedyr som f.eks. hest, gris, kanin, spesielt hunder eller katter.

[0022] Ifølge en utførelsesform er blant pattedyr behandlingen av villdyr og særlig kjøttetere foretrukket.

[0023] Også mennesket kommer i betraktning for behandlingen fordi det kan infiseres med den dyrpatogene giardiaarten via kontaminert drikkevann.

[0024] Giardiasis opptrer fremfor alt hos ungdyr fortrinnsvis i alderen av 3-10 uker og forårsaker alvorlig diaré og nedsatt vektøkning.

[0025] Anvendelsen av virkestoffene skjer direkte eller i form av egnede tilberedninger enteralt, parenteralt, dermalt.

[0026] Den enterale anvendelsen av virkestoffene foregår f.eks. oralt i form av pulver, stikkpiller, tabletter, kapsler, grøter, drikker, granulater, store doser, boli, fôr eller drikkevann tilsatt medisin. Den dermale anvendelsen skjer f.eks. i form av dynkning (dypping), påsprøyting (spraying), bading, vasking, påhelling (pour-on and spot-on) og pudring. Den parenterale anvendelsen foregår f.eks. i form av injeksjon (intramuskulært, subkutan, intravenøst, intraperitonealt o.a.) eller ved implantater.

[0027] Egnede tilberedninger er:

Løsninger som injeksjonsløsninger, orale løsninger, konsentrater for oral administrering etter fortynning, løsninger for anvendelse på huden eller i kroppshuler, påhellingsformuleringer, geler;
 Emulsjoner og suspensjoner for oral eller dermal anvendelse samt for injeksjon; halvfaste tilberedninger;
 Formuleringer der virkestoffet er innarbeidet i et salvegrunnlag eller i et olje i vann- eller vann i olje-emulsjonsgrunnlag;
 Faste tilberedninger som pulver, premikser eller konsentrater, granulater, pellets, tabletter, boli, kapsler; aerosoler og inhalater, virkestoffholdige formlegemer.

- [0028] Injeksjonsløsninger tilføres f.eks. intravenøst, intramuskulært og subkutant.
- [0029] Orale løsninger anvendes direkte. Konsentrater anvendes oralt etter at de er fortynnet til anvendelseskonsentrasjonen.
- [0030] Løsninger for anvendelse på huden påføres ved drypping, påstryking, påsmøring, påsprøyting, påspraying eller neddykking (dypping), bading eller vasking.
- [0031] Geler påføres eller strykes på huden eller føres inn i kroppshuler.
- [0032] Formuleringer for påhelling helles eller sprøytes på bestemte områder av huden hvorved virkestoffet enten trenger gjennom huden og virker systemisk eller fordeler seg på kroppsoverflaten.
- [0033] Emulsjoner er enten av typen vann i olje eller av typen olje i vann og kan anvendes oralt, dermalt eller som injeksjoner.
- [0034] Suspensjoner kan anvendes oralt, dermalt eller som injeksjon.
- [0035] Halvfaste tilberedninger kan tilføres oralt eller dermalt. De skiller seg fra de ovenfor beskrevne suspensjoner og emulsjoner bare ved sin høyere viskositet.
- [0036] For fremstilling av faste tilberedninger blandes virkestoffene med egnede bærerstoffer eventuelt med tilsetning av hjelpestoffer og bringes i den ønskede form.
- [0037] Ifølge oppfinnelsen er den orale anvendelsen spesielt foretrukket, av de vanlige orale anvendelsesformene er tabletter spesielt foretrukket.
- [0038] Alle ovenfor nevnte legemiddelformer, de anvendte tilsetnings- og hjelpestoffene samt fremstillingen av disse legemiddelformene er prinsipielt kjent for fagmannen.
- [0039] Virkestoffene kan foreligge i kombinasjon med synergister eller med ytterligere virkestoffer. Som ytterligere virkestoffer kan nevnes:

Coccidiosemidler som robenidin eller amprolium delvis i kombinasjon med folsyreantagonister (f.eks. pyrimetamin, epiroprim, trimetoprim); antibiotika som f.eks. clindamycin, paramomycin eller spiramycin; sulfonamider som f.eks. sulfadimetoksin, sulfadimidin, sulfadiazin; anthelmintika som f.eks.

cykliske depsipeptider (f.eks. emodepsid, PF1022A), amidinderivater (tribendimidin, amidantel, Bay d 9216), praziquantel eller benzyllbenzoat.

[0040] For en langvarig behandlingsvirkning er det fordelaktig samtidig å desinfisere dyreholdet.

[0041] Anthelmintika, særlig cykliske oktadepsipeptider som PF1022A eller emodepsid egner seg for bekjempelse av nematod-infeksjoner hos mennesker og dyr (16). Med denne avlives alle økonomisk betydningsfulle nematoder i mage-tarmkanalen blant annet også hos hunder. Det er også kjent at immunsvaret GALT = gut-associated-lymphoid-tissue) ved ikke-behandling av dyrene er rettet mot markene (17). Man kaller dette et Th2-svar fra immunsystemet. Vanligvis er immunsvaret ved ikke-infeksjon utbalansert, det vil si at motspilleren til Th2-svaret, nemlig Th1-svaret, som er rettet mot protozoer, virus og bakterier, er like høy som Th2-svaret.

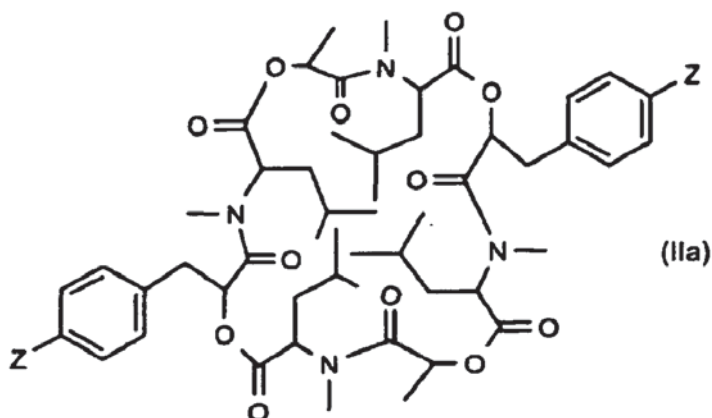
[0042] Foreligger det i angjeldende dyr, f.eks. i hunden, en nematod-infeksjon, f.eks. en infeksjon med hakeorm, spolorm eller piskeorm, så er balansen forstyrret og det oppstår overskytende en protozo-infeksjon i tarmen forårsaket f.eks. av Giardia. Helbredes nå nematod-infeksjonen med egnede anthelmintika, forsterkes indirekte motstandskraften mot Giardia ved at Th1-svaret da kommer til sin rett mot disse protozoer. I kombinasjonen nifurtimox med anthelmintika kan nifurtimox så lettere bekjempe Giardia-infeksjonen fordi denne allerede delvis holdes i grenser ved Th1-svaret som indirekte er forsterket ved hjelp av nematodbekjempelsen, det vil si parasittantallet i tarmen er allerede redusert.

[0043] Ifølge en foretrukket utførelsesform anvendes nifurtimox i kombinasjon med anthelmintika.

[0044] Foretrukket anvendte anthelmintika er 24-leddede cyclodepsipeptider (cyklooktadepsipeptider). Som slike kan nevnes:

Forbindelser med formel (IIa)

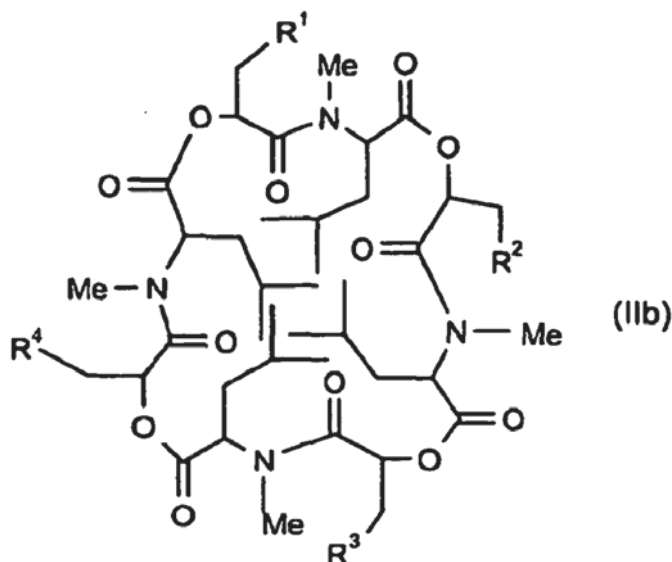
[0045]



hvor

Z betyr hydrogen, N- morfolinyl, NH_2 , mono- eller dimetylamino.

[0046] I tillegg skal det nevnes forbindelser med følgende formel (IIb):

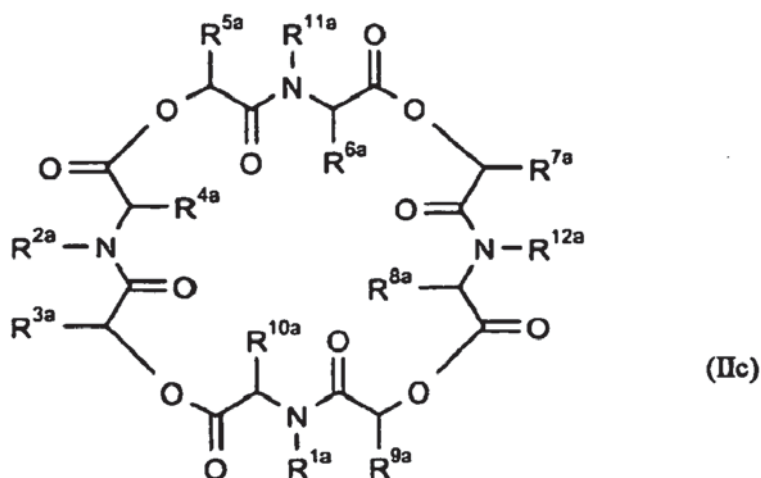


hvor

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 uavhengig av hverandre betyr hydrogen, C_1 - C_{10} -alkyl eller aryl, særlig fenyl som eventuelt er substituert med hydroksy, C_1 - C_{10} -alkoksy eller halogen.

[0047] Forbindelsene med generell formel (IIb) er kjente og kan fremstilles ifølge fremgangsmåtene 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.

[0048] Til de cycliske depsipeptidene med 24 ringatomer hører også forbindelser med generell formel (IIc)



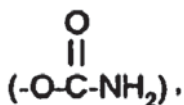
hvor

R^{1a} , R^{2a} , R^{11a} og R^{12a} uavhengig av hverandre betyr C_{1-8} -alkyl, C_{1-8} -halogenalkyl, C_{3-6} -cykloalkyl, aralkyl, aryl,

R^{3a} , R^{5a} , R^{7a} , R^{9a} uavhengig av hverandre betyr hydrogen eller rettkjedet eller forgrenet C_{1-8} -alkyl som eventuelt kan være substituert med hydroksy, C_{1-4} -alkoksy, karboksy,



karboksamid,



imidazolyl, indolyl, guanidino, -SH eller C_{1-4} -alkyltio og videre betyr aryl eller aralkyl som kan være substituerte med halogen, hydroksy, C_{1-4} -alkyl, C_{1-4} -alkoksy,

R^{4a} , R^{6a} , R^{8a} , R^{10a} uavhengig av hverandre betyr hydrogen, rettkjedet C_{1-5} -alkyl, C_{2-6} -alkenyl, C_{3-7} -cykloalkyl som eventuelt kan være substituerte med hydroksy, C_{1-4} -alkoksy, karboksy, karboksamid, imidazolyl, indolyl, guanidino, SH eller C_{1-4} -alkyltio, samt betyr aryl eller aralkyl som kan være substituerte med halogen, hydroksy, C_{1-4} -alkyl, C_{1-4} -alkoksy, samt deres optiske isomerer og racemater.

[0049] Foretrukkede forbindelser med formel (IIc) er slike hvor

R^{1a} , R^{2a} , R^{11a} og R^{12a} uavhengig av hverandre betyr metyl, etyl, propyl, isopropyl, n-, s-, t-butyl eller fenyl som eventuelt er substituert med halogen, C_{1-4} -alkyl, OH, C_{1-4} -alkoksy, samt betyr benzyl eller fenyletyl som eventuelt er substituerte med restene angitt ved fenyl;

R^{3a} til R^{10a} har den ovenfor angitte betydningen.

[0050] Spesielt foretrukkede forbindelser med formel (IIc) er slike hvor

R^{1a} , R^{2a} , R^{11a} og R^{12a} uavhengig av hverandre betyr metyl, etyl, propyl, isopropyl eller n-, s-, t-butyl,

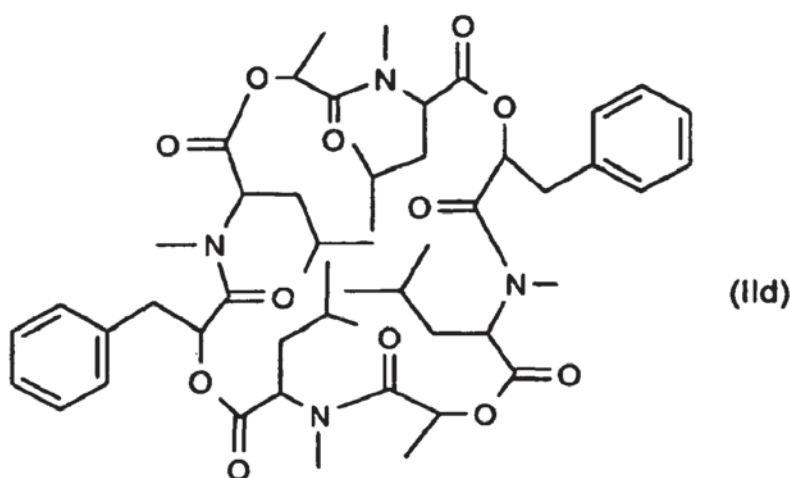
R^{3a} , R^{5a} , R^{7a} , R^{9a} betyr hydrogen, rettkjedet eller forgrenet C_{1-8} -alkyl, spesielt metyl, etyl, propyl, i-propyl, n-, s-, t-butyl som eventuelt kan være substituerte med C_{1-4} -alkoksy, spesielt metoksy, etoksy, imidazolyl, indolyl eller C_{1-4} -alkyltio, spesielt metyltio, etyltio, videre betyr fenyl, benzyl eller fenetyl som eventuelt er substituerte med halogen, spesielt klor.

R^{4a} , R^{6a} , R^{8a} , R^{10a} uavhengig av hverandre betyr hydrogen, metyl, etyl, n-propyl, n-butyl, vinyl, cykloheksyl som eventuelt er substituerte med metoksy, etoksy,

imidazolyl, indolyl, metyltio, etyltio, samt betyr isopropyl, s-butyl videre betyr eventuelt halogensubstituert fenyl, benzyl eller fenyletyl.

[0051] Forbindelsene med formel (IIc) kan likeledes fremstilles med fremgangsmåtene 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.

[0052] Som helt spesielt foretrukket depsipeptid nevnes forbindelsen PF 1022 kjent fra EP-OS 382 173, det dreier seg om forbindelsen med formel (IIa) hvori begge substituenten Z betyr hydrogen. PF har derfor følgende formel (IIId):

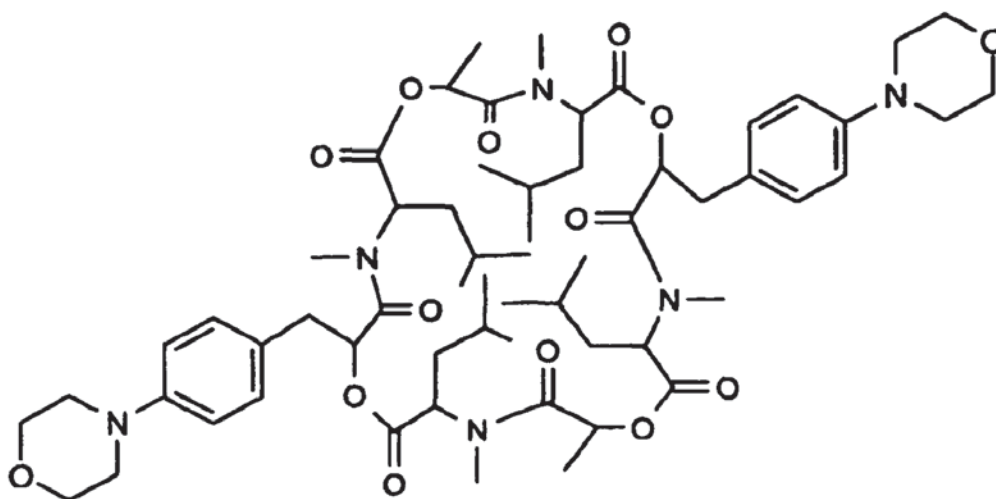


[0053] Ytterligere foretrukkede depsipeptider er forbindelser som er kjente fra WO 93/19053, nemlig forbindelser med formel (IIa)

hvor

Z betyr N-morfolinyl, NH₂, mono- eller dimetylamino.

[0054] Av disse forbindelser er depsipeptidet emodepside (PF 1022-221) spesielt foretrukket. Det dreier seg om forbindelsen med formel (IIa) hvori begge rester Z betyr en morfolinylrest. INN emodepsid står for forbindelsen med det systematiske navnet: cyklo[(R)-laktoyl-N-metyl-L-leucyl-(R)-3-(p-morfolinofenyl)laktoyl-N-metyl-L-leucyl-(R)-laktoyl-N-metyl-L-leucyl-(R)-3-(p-morfolinofenyl)laktoyl-N-metyl-L-leucyl. Emodepsid er beskrevet i WO 93/19053 og har følgende formel:



[0055] De ovenfor nevnte virkestoffene som egner seg for kombinasjon kan alt etter struktur foreligge i stereoisomere former eller som stereoisomerblandinger, f.eks. som enantiomerer eller racemater. Både stereoisomerblandingene og også de rene stereoisomerene kan anvendes ifølge oppfinnelsen.

[0056] I tillegg kan eventuelt anvendes: Salter av virkestoffene med farmasøytisk akseptable syrer eller baser og også solvater, spesielt hydrater, av virkestoffene eller deres salter.

[0057] Anvendelse i kombinasjon betyr enten at nifurtimox og det andre virkestoffet, særlig cyclodepsipeptid, kan anvendes adskilt eller tidsmessig gradert. I dette tilfellet er nifurtimox og det andre virkestoffet hver formulert som adskilte legemidler.

[0058] En samtidig anvendelse kan også tenkes. Ifølge en utførelsesform som er egnet for dette tilfellet er kombinasjonens virkestoffer formulert felles i ett middel. Tilberedninger ferdig for anvendelse inneholder det respektive virkestoffet vanligvis i konsentrasjoner av 10 ppm til 20 vekt-%, foretrukket fra 0,1 til 10 vekt-%.

[0059] Tilberedninger som fortynnes før anvendelse inneholder det respektive virkestoffet i konsentrasjoner av 0,5 til 90 vekt-%, foretrukket fra 5 til 50 vekt-%. I konsentrerte løsninger for inndosering i drikkevannet foreligger det respektive virkestoffet for eksempel i konsentrasjoner av 0,5 til 20 vekt-%, fortrinnsvis 1 til 15 vekt-%, spesielt foretrukket 2 til 10 vekt-%.

[0060] Generelt har det vist seg som fordelaktig å tilføre mengder av ca. 0,05 til ca. 400 mg, foretrukket 0,1 til 200 mg, virkestoff pr. kg kroppsvekt pr. dag for å oppnå virksomme resultater.

[0061] I blanding med andre coccidiosemidler, antibiotika eller anthelmintika foreligger virkestoffene ifølge oppfinnelsen i forholdet 1 til 0,01 - 50 opptil 1 til 1 - 50.

[0062] Virkestoffene kan også tilføres sammen med dyrefôret eller dyrenes drikkevann.

[0063] Fôr- og næringsmidler inneholder 0,005 til 1000 ppm, fortrinnsvis 0,05 til 500 ppm av virkestoffet i kombinasjon med et egnet spiselig material.

[0064] Et slikt fôr- og næringsmiddel kan anvendes både for terapeutiske formål og for profylaktiske formål.

[0065] For å supplere behandlingen med nifurtimox kan det anvendes et desinfeksjonsmiddel. Med desinfeksjonsmidlet desinfiseres dyrenes (hhv. menneskenes) oppholdssteder under behandlingen. Desinfeksjonsmidlet sørger fortrinnsvis ved hjelp av ødeleggelsen av de utskilte cysteformene for en eliminering av de parasitære varige stadiene og forhindrer derved en reinfeksjon etter endt behandling. Desinfeksjonsmidlet kan derfor anvendes allerede før behandlingen med nifurtimox, enda bedre er det derimot som regel å anvende det samtidig eller i det minste før avsluttet behandling med nifurtimox.

[0066] Desinfeksjonsmidler er f.eks. slike på basis av biocide fenoler og/eller fenolderivater. Med biocide fenoler menes slike fenolforbindelser som har en fri OH-gruppe og som oppviser en biocid virkning. Disse fenolene kan ha ytterligere ringssubstituenten som for eksempel halogener, spesielt klor, C₁₋₆-alkyl, C₃₋₆-cykloalkyl, fenyl, klorfenyl, benzyl og/eller klorbenzyl.

[0067] Ikke klorerte biocide fenoler er f. eks.: 2-metylphenol, 3-metylphenol, 4-metylphenol, 4-etylphenol, 2,4-dimetylphenol, 2,5-dimetylphenol, 3,4-dimetylphenol, 2,6-dimetylphenol, 4-n-propylphenol, 4-n-butylphenol, 4-n-amylphenol, 4-n-heksylphenol, tymol (5-metyl-2-isopropylphenol), 2-fenylphenol, 4-fenylphenol, 2-benzylphenol. Foretrukket som ikke klorert biocid fenol anvendes 2-fenylphenol.

[0068] Klorerte biocide fenoler er f.eks. 4-klor-3-metylphenol (PCMC, p-klor-m-kresol), 4-klor-3-etylphenol, 2-n-amyl-4-klorfenol, 2-n-heksyl-4-klorfenol, 2-cykloheksyl-4-klorfenol, 4-klor-3,5-xilenol (PCMX, p-klor-m-xilenol), 2,4-diklor-3,5-xilenol (DCMX, diklor-p-xilenol), 4-klor-2-fenylphenol, 2-benzyl-4-klorfenol, benzyl-4-klor-m-kresol, 4-klorbenzyl-diklor-m-kresol. Foretrukkede klorerte biocide fenoler er 2-benzyl-4-klorfenol, 4-klor-3,5-xilenol, 2,4-diklor-3,5-xilenol samt spesielt 4-klor-3-metylphenol.

[0069] Med fenolderivater menes her slike forbindelser avledet av fenol hvis OH-gruppe er derivatisert slik at de ikke inneholder noen fri OH-gruppe. Foretrukket er dette fenoleter, spesielt med alifatiske alkoholer med 1 til 6 karbonatomer. Som foretrukket eksempel nevnes fenoksyetanol.

[0070] Foretrukket anvendes desinfeksjonsmidlene beskrevet i WO 2007/009606 som inneholder biocider og et keratolytikum. Egnede biocider eller biocidkombinasjoner og egnede keratolytika er i detalj beskrevet i WO 2007/009606, dette dokumentet henvises det uttrykkelig til.

Eksempler

Formuleringseksempler

Eksempel 1 (flytende formulering)

[0071] Suspensjoner i 100 ml glyserolformal/glyserol-polyetylenglykolricinoleat (Cremophor® EL)/vann i blandingsforholdet 1 : 10 med:

- 500 mg nifurtimox
- 1000 mg nifurtimox

Eksempel 2 (flytende formulering)

[0072] Suspensjoner i 100 ml Cremophor® EL/vann i blandingsforholdet 1 : 5 med:

- 500 mg nifurtimox
- 1000 mg nifurtimox

Eksempel 3 (faststofformulering)

[0073] Virkestoffene fylles i de nedenfor angitte mengdene som pulver i en gelatinekapsel:

- 250 mg nifurtimox

Eksempel 4 (tablett)

[0074] Nifurtimox-tabletter er kjente og kan f.eks. fås som legemiddel under navnet Lampit®.

Biologiske eksempler

Eksempel 1

[0075] 10 – 11 uker gamle Beagle-valper som før infeksjonen kunne akklimatisere seg i dyresenteret, ble infisert oralt med 50.000 Giardia duodenalis-cyster. Cystene for infeksjonen fikk man ved hjelp av en sukrosegradient fra avføringen til hunder som

skilte ut Giardia-cyster, og lagret dem i et Bacto-casitone-medium i ikke mer enn 2 uker ved 4 grader celsius. Fra dag 10 etter infeksjonen ble valpene holdt i separate bur for å samle den individuelle daglige avføringen. Den kvantitative bestemmelsen av cysteutskillelsen foregikk i de 4 dagene før behandlingen (dag -3 til 0), og valpene ble randomisert ved hjelp av cysteutskillelsen i to grupper. På dag 0 ble behandlingen av de 7 valpene fra behandlingsgruppen foretatt en gang med en oral tilføring av 50 mg/kg nifurtimox (Lampit®), mens de 6 hundene fra kontrollgruppen forble ubehandlet. Fra dag 1 til dag 8 etter behandlingen ble cysteutskillelsen videre bestemt kvantitativt.

Resultater: Virkningen ble beregnet med følgende formel:

$$\text{Virkning \%} = \frac{\text{Antall cyster fra kontrollgruppen} - \text{antall cyster fra behandlingsgruppen}}{\text{Antall cyster kontrollgruppe}} \times 100$$

[0076] Den beregnede virkningen ved engangs tilføring av nifurtimox var 90,4 % (se tabell 1).

[0077] Metode: Den kvantitative bestemmelsen av cysteutskillelsen ble foretatt ifølge en modifisert versjon av Hewlett (18): 4 g avføring ble løst i 100 ml vann, siktet og latt sedimentere. Sedimentet ble lagt i lag på 1 M sukrosegradient (spes. vekt 1,13), og cystene som etter sentrifugering konsentrerte seg på sukrose-vann-separasjons-sjiktet, ble avpipetert. Etter et skylletrinn med etterfølgende sentrifugering ble cystene målt i pellet. For dette ble det en alikvot til pellet telt opp under mikroskopet, og antallet cyster pr. gram avføring ble beregnet.

Tabell 1: Giardia-cysteuskillelse før og etter behandling med nifurtimox

50 mg/kg nifurtimox på dag T0												
Hund	T -3	T -2	T -1	T 0	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8
9048	22402	186750	189275	19681	0	0	0	424	0	0	191	1621
9028	5259	45672	45725	16419	2636	180	224	1451	1318	4102	4615	1768
8343	5339	28322	26163	13644	2391	0	0	193	153	6315	223	508
8329	29625	907	1306	4397	504	0	0	590	1700	3693	8881	3294
9040	1063	923	14238	8456	4928	0	0	0	1094	2000	431	517
9038	1385	5897	2264	0	152	0	0	0	0	1201	1873	14181
9020	3263	905	788	375	0	0	0	652	137	353	608	0
Σ	9762	38482	39966	8996	1516	26	32	473	629	2523	2403	3127
Infisert, ubehandlet kontroll												
Hund	T -3	T -2	T -1	T 0	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8
9008	65325	41925	368	0	450	179	1183	3288	4747	14232	22237	3684
8341	21150	44988	35525	3138	1332	806	23399	17739	27253	9321	2660	12901
8309	7144	34613	33688	4531	25050	13238	5547	26106	52000	5125	47365	47999
8327	21250	21485	1350	3991	5383	4520	3529	17355	6145	14298	25331	110846
8313	2975	3185	8168	1209	609	6133	8438	6739	18113	4027	7103	2645
9026	945	2813	1723	2038	3544	3366	20163	11291	6719	4621	5867	5621
Σ	19798	24835	13470	2485	6061	4707	10377	13753	19163	8604	184427	30616
T -3 til T -1: dager før behandlingen												
T 0: behandlingsdagen												
T 1 bis T 8: dager etter behandlingen												

Behandling	E Giardien-cysteutskillelse		Virkning
	Dag -3 til 0	Dag 1 til 8	
50 mg/kg nifurtimox	24302	1341	90.4%
Infisert, ubehandlet kontroll	15147	13963	-

Eksempel 2

[0078] 11 – 15 uker gamle Beagle-valper som før infeksjon kunne akklimatisere seg i minst 2 uker i dyresenteret, ble før start av studien infisert oralt med 50.000 *Giardia duodenalis*-cyster. Cystene for infeksjonen fikk man ved hjelp av en sukrosegradient fra avføringen til hunder som skilte ut *Giardia*-cyster, og lagret dem i et Bactocasitone-medium i ikke mer enn 2 uker ved 4 grader celsius. 18 valper som skilte ut *Giardia*-cyster ble tatt med i studien og holdt i separate bur for å samle den daglige totale avføringen. Den kvantitative bestemmelsen av cysteutskillelsen foregikk som i forsøk 145.717 med den modifikasjonen at aliquot til pellet ble telt under mikroskopet ved hjelp av et Fuchs-Rosenthal-tellekammer. Den kvantitative bestemmelsen av cysteutskillelsen foregikk i 4 dager før behandling (dag -3 til 0), og valpene ble ved hjelp av cysteutskillelsen randomisert i 3 grupper. På tre påfølgende dager (dag 0, 1 og 2) ble behandlingen av de 6 valpene i behandlingsgruppe 1 foretatt om morgenen med en oral administrering av 50 mg/kg nifurtimox (Lampit®), mens de 6 hundene i behandlingsgruppe 2 på disse tre dagene om morgenen ble behandlet med en oral administrering av 50 mg/kg fenbendazol (fenbendazol-tab). De 6 hundene i kontrollgruppen forble ubehandlet. Fra dag 1 til dag 8 etter behandlingen ble cysteutskillelsen videre bestemt kvantitativt.

Resultater: Den beregnede virkningen av nifurtimox var 98,6 %, mens virkningen av fenbendazol var 48,3 %. (Se tabell 2)

Tabell 2: Giardia-cysteutskillelse før og etter behandlingen med nifurtimox sammenlignet med behandlingen med fenbendazol.

50 mg/kg nifurtimox på dagene T0, T1 og T2												
Hund	T -3	T -2	T -1	T 0	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8
9300	63463	79689	91293	103442	1261	527	0	0	0	0	0	903
0136	10290 0	68914	59273	112084	2000	0	0	622	1299	93	0	0
0116	57571	10685	25515	60420	809	741	0	0	229	0	0	517
8553	40909	8278	3472	675	187	0	0	185	0	98	0	0
8531	4891	1618	37203	89880	974	0	0	0	0	0	87	975
0134	28773	133	8528	86	0	0	0	0	2299	1842	237	0
Σ	49751	28220	37547	61098	872	211	0	135	638	339	54	399
50 mg/kg fenbendazol på dagene T0, T1 og T2												
Hund	T -3	T -2	T -1	T 0	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8
0117	18781	47754	243143	49400	67200	0	67109	49423	3116	4635	1747 4	0
9320	60193	23808	56014	28559	14596	5980	7043	652	18725	7546	2078 0	5555
8555	44218	26526	2349	639	872	0	961	439	4432	5594	260	5968
8543	34119	18113	16328	2719	12488	3386	3075	12038	0	3691	1805 6	10875
0135	20463	7230	14744	17037	6178	490	0	0	0	0	251	0
9328	2003	10109	21360	23290	723	552	5388	14133	19057	11495	2065	6370

50 mg/kg nifurtimox på dagene T0, T1 og T2												
Hund	T -3	T -2	T -1	T 0	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8
											7	
Σ	29963	22257	58990	20274	17010	1735	13929	12781	7555	5494	12913	4795
Infisert, ubehandlet kontroll												
Hund	T -3	T -2	T -1	T 0	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8
0121	112757	27324	121092	108868	153336	64620	6127	190	6879	85408	73978	50256
0138	22125	65547	60200	26964	22234	855	17893	8138	13204	3681	439	1470
9332	22346	34475	42076	24466	24360	19145	12575	1455	5712	16122	21440	12563
8529	8884	49213	12881	32105	71378	1139	6409	4739	5297	23725	11626	2835
9330	18829	4711	22120	2476	1987	0	246	2492	4472	602	2052	813
0137	4623	12238	14406	14328	2134	10156	16756	0	8170	104020	79097	55935
Σ	31594	32251	45463	34868	45905	15986	10001	2836	7289	38926	31439	20645
T -3 til T -1: dager før behandlingen												
T 0, T1, T2: behandlingsdager												
T 3 bis T 8: dager etter behandlingen												

Behandling	Σ Giardia-cysteutskillelse		Virkning
	Dag -3 til 0	Dag 3 til 8	
50 mg/kg nifurtimox	44154	261	98.6%
50 mg/kg fenbendazol	32871	9578	48.3 %
Infisert, ubehandlet kontroll	36044	18523	-

Litteratur

[0079]

1. (1) Raether W., Hänel H. (2003): Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity Parasitol Res. 90:S19-S39.
2. (2) Harder A, Greif G, Haberkorn A (2001a): Chemotherapeutic approaches to protozoa: Haemosporina - current level of knowledge and outlook.
3. (3) Harder A, Greif G., Haberkorn A. (2001b): Chemotherapeutic approaches to protozoa: Giardia, Trichomonas and Entamoeba - current level of knowledge and outlook.
4. (4) Greif G, Harder A, Haberkorn A (2001): Chemotherapeutic approaches to protozoa: Coccidia - current level of knowledge and outlook.
5. (5) Harder A, Greif G, Haberkorn A (2001c): Chemotherapeutic approaches to protozoa: Kinetoplastida - current level of knowledge and outlook. Parasitol Res 87:778-780.
6. (6) Adam R.D. (2001): Biology of Giardia lamblia. Clinical Microbiology Reviews, July: 447-475.
7. (7) Marshall MM, Naumovitz D., Ortega Y., Sterling CR. (1997): Waterborne Protozoan Pathogens. Clinical Microbiology Reviews Jan:67-85.
8. (8) Roxström-Lindquist, K. Palm D., Reiner D., Ringqvist E., Svärd SG. (2006): Giardia immunity - an update. Trends in Parasitology Vo. 22(1):26-31.
9. (9) Beckmann L. (2003): Mucosal defences against Giardia. Parasite Immunology 25:259-270.
10. (10) Hülsmeier A.J., Köhler P. (2005): Giardia duodenalis: direct experimental evidence for the absence of a glycosylphosphatidylinositol anchor in a variant surface protein. Experimental Parasitology 109:49-52.
11. (11) Kirkpatrick, CE, Farrell JP (1984): Feline giardiasis: observations on natural and induced infections. Amer. J. Vet. Res. 45:2182-2188.
12. (12) Zimmer JF, Burrington DB (1986): Comparison of four protocols for the treatment of canine giardiasis. J. Amer. Anim. Hosp. Ass. 22:168-172.

13. (13) Abbitt B, Huey RL, Eugster AK, Syler J. (1986): Treatment of giardiasis in adult greyhounds, using ipronidazole-medicated water. J. Amer. Vet. Med. Ass. 188:67-69.
14. (14) Wright JM., Dünn L.A., Upcroft P., Upcroft J.A. (2003): Efficacy of anti giardial drugs. Expert Opin. Drug Saf. 2(6):529-541.
15. (15) Escobedo A.A & Cimerman S. (2007): Giardiasis: a pharmacotherapy review. Expert Opin. Pharmacother. 8(12):1885-1902.
16. (16) Harder A. et al. (2003): Cyklooctadepsipeptides - an anthelmintically active class of compounds exhibiting a novel mode of action. Int. J. Antimicrobial Agents. 22 : 318-331.
17. (17) Mehlhorn (ed) (2001): Giardiasis, Man; Encyklopedic Reference of Parasitology, Diseases, treatment, Therapy, Second Edition, Springer-Verlag, pp. 234-235.
18. (18) Hewlett, E.L., Andrews, J.S.Jr., Ruffier, J., Schaefer III, F.W. (1982): Experimental Infection of Mongroel Dogs with Giardia lamblia Cysts and Cultured Trophozoites In: The Journal of infectious diseases, Vol. 145, No. 1, pp 89-93

Patentkrav

1. Anvendelse av nifurtimox for fremstilling av legemidler for behandling av sykdommer forårsaket av *Giardia*.
2. Anvendelse ifølge krav 1 for behandling av sykdommer forårsaket av *Giardia lamblia*.
3. Anvendelse ifølge ett av kravene 1 eller 2 for behandling av katter eller hunder.
4. Nifurtimox for behandling av sykdommer forårsaket av *Giardia*.
5. Nifurtimox for anvendelse ifølge krav 4 for behandling av sykdommer forårsaket av *Giardia lamblia*.
6. Nifurtimox for anvendelse ifølge ett av kravene 4 eller 5 for hunder eller katter.
7. Middel inneholdende nifurtimox og et anthelmintikum.
8. Middel inneholdende nifurtimox og et anthelmintisk cyklooctadepsi-peptid.
9. Middel ifølge krav 8 inneholdende PF 1022 som anthelmintisk cyklooctadepsi-peptid.
10. Middel ifølge krav 8 inneholdende emodepsid som anthelmintisk cyklooctadepsi-peptid.