



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 740**

51 Int. Cl.:

A61K 31/365 (2006.01)

A61K 31/366 (2006.01)

A61K 31/415 (2006.01)

A61K 31/4164 (2006.01)

A61K 31/4192 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

A61P 33/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04817400 .7**

96 Fecha de presentación : **03.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1682118**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

54 Título: **Formulaciones ectoparasitcidas de espinosinas y pesticidas de azol.**

30 Prioridad: **04.11.2003 EP 03078569**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73 Titular/es: **Intervet International B.V.**
Wim de Körverstraat, 35
5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es: **Mertens, Christina;**
Dohrmann, Heike y
Rshaid, Gabriel Aldolfo Marcos

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

Formulaciones ectoparasitcidas de espinosinas y pesticidas de azol.

5 La presente invención se refiere a formulaciones que comprenden una combinación de diferentes ingredientes activos con actividad antiparasitaria para el control de ectoparásitos, y a un método para la fabricación de un medicamento para controlar la infestación por ectoparásitos administrando los ingredientes activos en combinación, o simultáneamente o secuencialmente.

10 Diversas plagas y parásitos pueden infestar o infectar animales domésticos tales como ganado, caballos, cerdos, ovejas pero también animales de compañía tales como gatos y perros. Estas plagas y parásitos son de gran perjuicio tanto para los animales como para sus dueños. Parásitos externos tales como garrapatas, ácaros, piojos y pulgas irritan a los animales y pueden provocar enfermedades, por sí mismos o portando patógenos transmitidos por vector.

15 Las garrapatas son importantes parásitos artrópodos que se alimentan de sangre que pertenecen junto con los ácaros al orden *Acarina*. Hay dos familias de garrapatas bien establecidas, *Ixodidae* (garrapatas duras) y *Argasidae* (garrapatas blandas). Las garrapatas producen lesiones después de la infestación de animales en tres aspectos: daño directo causado por parasitismo tales como lesiones locales y pérdida de sangre; por toxinas inyectadas por los parásitos y por la transmisión de enfermedades. Especialmente en animales de compañía, las garrapatas pueden ser fuente de enfermedades zoonóticas.

Muchos ácaros, del orden prostigmata y astigmata, como resultado de su mordedura o sus hábitos alimenticios, pueden provocar enfermedades graves y son un grave perjuicio para sus huéspedes.

25 Las pulgas son los ectoparásitos más habituales en gatos y perros, *Ctenocephalides felis felis* y *Ctenocephalides canis*, respectivamente. No obstante, las pulgas del gato también infestan a perros. La pulga del gato puede transmitir también enfermedades en perros tales como la teniasis.

30 Se desean métodos seguros, eficaces para eliminar estos parásitos tanto para el bienestar del animal de compañía como para el bienestar y el confort de su ser humano asociado y para la prevención de pérdidas de ganado.

De este modo, continúa habiendo una necesidad de compuestos y combinaciones de los mismos que pueden usarse como agentes activos contra ectoparásitos, especialmente aquellos que aquejan a animales domésticos, y que son eficaces a índices de aplicación bajos, selectivos en acción biológica y tienen una toxicidad baja.

35 La presente invención proporciona ahora combinaciones antiparasitarias de espinosinas con pesticidas de azol para el control de ectoparásitos.

40 Las espinosinas (también conocidas como factores A83453) son insecticidas agrícolas que han mostrado actividad contra el noctuido sureño y otros insectos del orden *Lepidophthera*, y el áfido del algodón y otros miembros del orden *Homophthera* (véase por ejemplo la Patente de Estados Unidos N° 5.571.901). Las espinosinas también se conocían por tener alguna actividad ectoparasitcida, es decir, actividad *in vitro* contra la larva de mosquito, larva negra de la mosca azul, y moscas adultas estables, que son miembros del orden de insectos *Diptera*, y actividad sistémica transitoria contra la larva de la mosca azul y la mosca adulta estable en cobayas y ovejas (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.571.901).

45 El producto de fermentación A83543, también conocido como espinosina, incluye una familia de compuestos relacionados (espinosinas) producidos por *Saccharopolyspora spinosa*. Estos son productos de fermentación derivados de forma natural con un perfil de seguridad positivo y se ha mostrado previamente que exhiben una buena actividad insecticida. Las espinosinas se conocen también como “compuestos A83543” y son compuestos que consisten en un sistema de anillo tricíclico-5, 6, 5, condensado con una lactona macrocíclica de 12 elementos, un azúcar natural (2N,3N,4N-tri-O-metilramnosa) y un aminoazúcar (fructosamina). Las diversas espinosinas se caracterizan por diferencias en los patrones de sustitución del grupo amino de la forosamina, en sitios seleccionados sobre el sistema de anillo tetracíclico y sobre el grupo de 2N,3N,4N-(tri-O-metil)ramnosa.

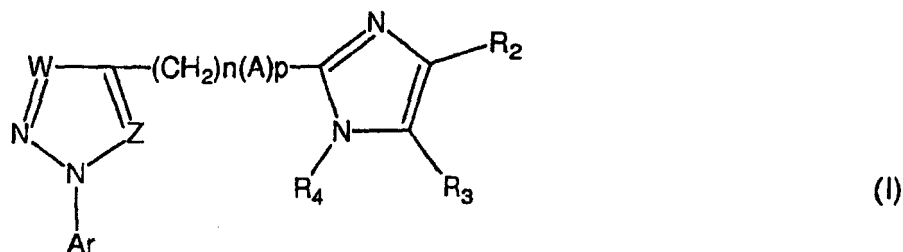
50 El uso de las espinosinas en preparaciones orales para el tratamiento de perros contra ectoparásitos (garrapatas) se menciona en el documento WO 01/11963. Las espinosinas se usaron en una dosificación relativamente alta, pero solo mostraron actividad limitada contra las garrapatas.

60 Los pesticidas de azol se describen en el documento EP 412849. El documento EP 412849 describe algunos aril-1,2,3 triazoles y arilpirazoles en los que el grupo imidazol(in) se une directa o indirectamente a través de su posición-2 al anillo de triazol o pirazol que tiene actividad pesticida.

65 Se ha descubierto ahora que combinando un pesticida de azol del tipo descrito en el documento EP412849, y un pesticida de tipo espinosina, puede obtenerse un amplio espectro de formulación ectoparasitaria que es altamente efectivo en una dosis baja.

ES 2 315 740 T3

La presente invención proporciona a este efecto una formulación antiparasitaria caracterizada porque comprende una combinación de una o más espinosinas con un compuesto de fórmula (I)



y sales del mismo, en la que

Ar es 2,6-dicloro-4-trifluorometilfenilo o 2-nitro-4-trifluorometilfenilo;

A es $S(O)_m$, $-CH=CH-$, O o NH;

W es N y Z es CR^5 ; o W es CR^1 y Z es N o CR^5 ;

R^1 es hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, halógeno o $R^{20}S(O)_q$;

R^2 y R^3 son hidrógeno, alquilo, alquenilo o alquinilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido, arilo, ciano, halógeno, nitro, YR^{20} , $S(O)_2NR^8R^9$, CHO, NR^8R^9 , o $CYNR^8R^9$;

R^4 es hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, acilo u alcocarbonilo opcionalmente sustituido;

R^5 es hidrógeno, alquilo, amino opcionalmente sustituido o halógeno;

R^8 y R^9 son iguales o diferentes y son hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, acilo o arilo;

R^{20} es alquilo opcionalmente sustituido;

Y es O o S;

m es 0, 1 o 2;

p es 0 o 1;

n es 0, 1 o 2 y;

q es 0, 1 o 2;

y en la que a) cualquier grupo alquilo, alcoxi y alquiltio es de 1 a 4 átomos de carbono; b) cualquier grupo alquenilo o alquinilo es de 2 a 5 átomos de carbono; c) cualquier grupo alquilo, alcoxi, alquiltio, alquenilo o alquinilo sustituido está sustituido con uno o más grupos iguales o diferentes seleccionados entre halógeno, YR^{20} , dicitropililo, ciano, nitro, amino opcionalmente sustituido, aciloxi y arilo; d) cualquier grupo arilo es fenilo, opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo, haloalquilo, alcoxi, haloalcoxi, alquiltio, haloalquiltio, haloalquilsulfonilo, ciano o nitro; e) cualquier grupo acilo es alcanilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alquilsulfonilo o haloalquilsulfonilo; y f) cualquier grupo amino sustituido opcionalmente es de fórmula NR^8R^9 , con la condición de que cuando W es CR^1 y Z es CR^5 y n y p son ambos 0, R^4 no es alquilo.

R^4 es preferiblemente hidrógeno. Cuando W es CR^1 y Z es CR^5 y n y p son ambos 0, pero también para todos los demás compuestos, se prefiere que al menos uno, y especialmente ambos, de R^2 y R^3 sean ciano, n y p son preferiblemente 0. R^5 es preferiblemente halógeno, especialmente cloro.

Los pesticidas de azol descritos anteriormente se han descrito en el documento EP412849. También se describen en el documento EP412849 métodos de cómo pueden prepararse estos compuestos.

Un compuesto especialmente preferido para uso en las formulaciones de acuerdo con la invención es 5-cloro-1-(2,6-dicloro-4-trifluorometilfenil)-4-(4,5-diciano-1H-imidazol-2-il)-3-isopropil-1H-pirazol, que es el compuesto indicado como compuesto 22c en el documento EP412849. La síntesis de este compuesto se describe en el ejemplo 22b del documento EP412849. En el resto de esta solicitud se hará referencia a este compuesto como "compuesto 22c".

ES 2 315 740 T3

Por lo que respecta a las espinosinas usadas en las formulaciones de acuerdo con la invención, se da preferencia particular al uso de espinosad (véase por ejemplo DowElanco trade magazine Down to earth Vol. 52, No. 1, 1997 y bibliografía citada en el mismo), que esencialmente consiste en una mezcla de espinosina A y espinosina D en una proporción de aproximadamente 85:15. Se hace uso, en particular, del producto de fermentación A 83543 conocido de la Patente de Estados Unidos N° 5.362.634 que comprende aproximadamente del 85 al 90% de espinosina A, aproximadamente del 10 al 15% de espinosina D y cantidades menores de espinosinas B, C, E, F, G, H y J.

Las espinosinas pueden reaccionar para formar sales que también son útiles en la presente invención. Las sales se preparan usando procedimientos convencionales para la preparación de la sal. Por ejemplo, la espinosina A puede neutralizarse con un ácido apropiado para formar una sal de adición de ácidos. Las sales de adición de ácidos de espinosinas son particularmente útiles. Las sales de adición de ácidos representativas adecuadas incluyen sales formadas por reacción con un ácido orgánico o inorgánico.

La combinación más preferida es una combinación del compuesto 22c y espinosad.

No es necesario que los ingredientes activos sean parte de una y de la misma preparación física. Pueden ser parte también de preparaciones diferentes.

Los ingredientes activos pueden administrarse al mismo tiempo, es decir simultáneamente, pero también pueden administrarse secuencialmente, es decir uno después de otro. Si se dan secuencialmente, un ingrediente activo es detectable sobre/en el animal huésped cuando se aplica el otro.

De esta manera, en otra realización la invención se refiere al uso de una o más espinosinas y al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como ingredientes activos en un método para la fabricación un medicamento para controlar una infestación por ectoparásitos administrando los ingredientes activos en combinación, simultáneamente o secuencialmente.

Los ingredientes activos se administran preferiblemente de manera simultánea. Cuando se dan simultáneamente, la combinación se presenta preferiblemente como una formulación, que es una preparación física individual que comprende tanto el compuesto de fórmula 1 como la espinosina o espinosinas.

Las formulaciones de la invención pretenden usarse para controlar una infestación ectoparasitaria. El término “controlar una infestación por ectoparásitos” se refiere a prevenir, minimizar o eliminar una infestación por un ectoparásito. El término “ectoparásito” se refiere a plagas de insectos y ácaros que habitualmente infestan o infectan animales. Los ejemplos de dichos ectoparásitos incluyen las fases de huevo, larva, pupa, ninfa y adulta del piojo, pulga, mosquitos, ácaros, garrapatas y especies de moscas chupadoras de sangre, mordedoras o molestas.

En general, las formulaciones de acuerdo con la invención contendrán una cantidad eficaz de ingredientes activos, lo que significa una cantidad suficiente pero no tóxica para proporcionar el efecto terapéutico deseado. Una persona especialista en la técnica puede determinar una cantidad apropiada “eficaz” en cualquier caso individual usando experimentación rutinaria. Dicha cantidad dependerá de la edad, estado, peso y tipo del animal diana.

Los animales pueden recibir una dosificación diaria, semanal o mensual, opcionalmente precedida por una dosis de carga mayor (dosis inicial mayor). El tratamiento puede, por ejemplo, ser continuado o estacional.

La proporción entre el compuesto de fórmula (I) y una o más espinosinas cuando se usan en combinación es preferiblemente de 1:10 a 10:1.

Preferiblemente, el tratamiento se realiza para administrar al animal una dosis de 0,1 a 100 y en particular de 1 a 40 mg/kg de peso corporal del compuesto de fórmula (I) y una dosis de 0,1 a 100 y en particular de 1 a 40 y más preferiblemente menor de 30 mg/kg de peso corporal del compuesto o compuestos de espinosina. Estas dosificaciones han demostrado ser eficaces, especialmente en animales de compañía tales como perros.

Preferiblemente, la combinación de los ingredientes activos se administra sistémicamente. La administración sistémica es la administración de la combinación en un sitio alejado del sitio donde reside el parásito, por ejemplo, a un animal por la boca, por inyección, por implantes, o por otros medios, por ejemplo liberación transdérmica tal como por aplicación puntual o por vertido, de modo que hay suficiente agente en los tejidos o los fluidos corporales para matar al parásito que está alimentándose sobre el animal.

Las formulaciones de la invención se administran preferiblemente en una formulación oral. El término “formulación oral” significa que los ingredientes activos se formulan con un producto adecuado para administrárselo al animal por la boca. Estas formulaciones incluyen, aunque sin limitación, comprimidos, cápsulas, líquidos, geles, pastas, pulverizadores orales, formulaciones bucales, polvos, gránulos, pastillas masticables o piensos para animales que contienen los ingredientes activos. Generalmente dichas formulaciones incluyen un vehículo fisiológicamente aceptable. Dichos vehículos se conocen bien en la técnica veterinaria.

Los comprimidos convencionales generalmente comprenden los ingredientes activos, un diluyente para ayudar a aumentar la masa de polvo a un tamaño conveniente y mejorar la compresibilidad, un aglutinante para mantener el

polvo comprimido unido y un lubricante para ayudar en la densificación y expulsión del troquel del comprimido. Puede contener además un disgregante para mejorar la disgregación y la disolución así como estabilizadores, colores y sabores. Los comprimidos a menudo se recubren para mejorar la apariencia o sabor o para alterar las propiedades de disolución. Los comprimidos pueden diseñarse para disolverse de manera rápida o lenta y dependiendo del volumen real y la compresibilidad del medicamento, pueden ser grandes o pequeños. Pueden hacerse masticables o para disolver bajo la lengua o en el carrillo. Las formulaciones líquidas convencionales normalmente son soluciones, suspensiones o emulsiones del componente junto con diluyentes adecuados, disolventes, aromatizantes y colorantes para formar una forma de dosificación apetitosa. Preferiblemente, las formulaciones de acuerdo con la invención se proporcionan como comprimidos, preferiblemente comprimidos masticables que pueden darse, por ejemplo a perros, como una golosina.

Los comprimidos pueden formularse para contener una cantidad de ingredientes activos que se ajuste a los animales en un intervalo de peso específico.

En general, la formulación de acuerdo con la presente invención se puede administrar a todas las especies de animales que tengan infestación por ectoparásitos. El destinatario de la formulación puede ser un animal de ganadería, por ejemplo una oveja, ganado, cerdo, cabra, ave de corral, y animales de ensayo de laboratorio, por ejemplo una cobaya, rata o ratón o un animal de compañía por ejemplo, un perro, gato, conejo o caballo. Las formulaciones de acuerdo con la invención son especialmente adecuadas para uso en animales de compañía, por ejemplo, perros.

20 Ejemplos

Ejemplo 1

Eficacia y tolerabilidad del compuesto 22c en combinación con Espinosad

Se infestaron dos grupos, de 6 perros cada uno (grupo A y grupo B), con pulgas (*Ctenocephalides felis*) y garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) antes y repetidamente en momentos diferentes después del tratamiento.

Los perros del grupo B sirvieron como control de no tratados, los perros del grupo A se trataron oralmente con el Compuesto 22c en combinación con espinosad. Para el Compuesto 22c se usó una dosis inicial de 4 mg/kg de peso corporal (pc) en el día 0 (d0), seguido de 3 dosis semanales (d+7, d+14, d+21) de 2 mg/kg pc. Se suministró espinosad en una dosis inicial de 30 mg/kg en el d0, seguido de dosis semanales de 15 mg/kg en d+7, d+14 y d+21.

Se evaluó la carga de parásitos en perros individuales 48 horas después de cada infestación retirando y contando las garrapatas y las pulgas. Se clasificaron las pulgas y las garrapatas de acuerdo a la vitalidad (muerta/viva) y el estado parasitario de las garrapatas (hinchadas/no hinchadas; adheridas/libres). Se usó el número de parásitos para calcular la eficacia. La combinación del Compuesto 22c y el espinosad se toleró bien durante todo el estudio.

A continuación se indican los detalles de los procedimientos del estudio:

Procedimientos de estudio (Materiales y Métodos)

Especificaciones del producto

Comprimido del Compuesto 22c

Ingrediente activo: Compuesto 22c (Ch. HT/a 99,1%)

Fórmula del producto: Compuesto 22c 10,0% (p/p)

Dosificación: Por vía oral: dosis inicial 4 mg/kg de masa corporal; dosis de mantenimiento 2 mg/kg de masa corporal

Aplicación: *Per os*

Cápsula de espinosad

Ingrediente activo: 99%

Formulación: 87% de Espinosina A 12% de Espinosina D

Dosificación: Por vía oral: dosis inicial 30 mg/kg de masa corporal; dosis de mantenimiento 15 mg/kg de masa corporal

Aplicación: *Per os* (en cápsulas de gelatina)

ES 2 315 740 T3

Animales del estudio

Especie: Perro doméstico

Número: 12

Estado de salud: Los perros estaban sanos al comienzo del estudio según determina el veterinario en el día -2. Ningún perro se había tratado con un acaricida/insecticida durante al menos las 8 semanas anteriores al estudio

Identificación: Número de oreja y chip

Alojamiento del animal

Los animales de estudio se mantuvieron en el interior en corrales individuales con suelos de hormigón y un área de descanso especial que permitía la recogida de parásitos del entorno. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con las directrices existentes para el “Ensayo y evaluación de la eficacia de las sustancias antiparasitarias para el tratamiento y prevención de la infestación de la garrapata y la pulga en perros y gatos” (EMEA/CVMP/005/00) proporcionando la máxima comodidad a los perros en las condiciones de estudio.

Infestación por parásitos

Se infestó a los perros experimentalmente con cepas de laboratorio de *Rhipicephalus sanguineus* (80 adultos no alimentados; proporción de sexo 1:1) (garrapatas) y *Ctenocephalides felis* (100 adultos, edad similar; proporción de sexo aprox. 1:1) (pulgas) de acuerdo con la tabla 1. Las pulgas y las garrapatas se aplicaron directamente sobre el lomo del animal. Las garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) y las pulgas (*Ctenocephalides felis*) se infestaron el día 2, día +3, día +5, día +7, día +10, día +12, día +14, día +17, día +19, día +21, día +24, día +26.

Tratamiento

Los perros del grupo A se trataron de acuerdo con el calendario establecido en la Tabla 1. Los perros del grupo B se infestaron pero no se trataron y sirvieron como control de no tratados.

Ruta y método de administración

Para calcular las dosis del Compuesto 22c se usaron los pesos corporales. La unidad más pequeña que se había usado era medio comprimido del Compuesto 22c. Los comprimidos no se ranuraron sino que se partieron en piezas iguales usando un cortador de comprimidos. Cuando fue necesario la dosis se redondeó a lo más parecido a medio comprimido. Se administró espinosad como una cápsula individual. Antes de cada tratamiento, la dosis individual para cada perro era el peso en la cápsula de acuerdo con el peso corporal real.

Se dieron ambos productos a los perros ocultos en una pequeña cantidad de comida para perros. Antes de la aplicación se ensayó si el perro individual aceptaría la comida. Ambos productos se aplicaron directamente a la parte posterior de la lengua para inducir la ingestión cuando el perro rechazara la comida. Se registraron las dosis administradas.

(Tabla pas a página siguiente)

ES 2 315 740 T3

TABLA 1

Esquema de infestación, tratamiento y evaluación

Día	Infestación		Evaluación		Tratamiento	
	<i>Garrapatas</i>	<i>Pulgas</i>	<i>Garrapatas</i>	<i>Pulgas</i>	<i>Compuesto 22c</i>	<i>Espinosa d</i>
d-2	80	100				
d-1						
d0					4 mg/kg	30 mg/kg
d1						
d2			X	X		
d3	80	100				
d4						
d5	80	100	X	X		
d6						
d7	80	100	X	X	2 mg/kg	15 mg/kg
d8						
d9			X	X		
d10	80	100				
d11						
d12	80	100	X	X		
d13						
d14	80	100	X	X	2 mg/kg	15 mg/kg
d15						
d16			X	X		
d17	80	100				
d18						
d19	80	100	X	X		
d20						
d21	80	100	X	X	2 mg/kg	15 mg/kg
d22						
d23			X	X		
d24	80	100				

Día	Infestación		Evaluación		Tratamiento	
	Garrapatas	Pulgas	Garrapatas	Pulgas	Compuesto 22c	Espinosad
d25						
d26	80	100	X	X		
d27						
d28			X	X		
d30						
d33						

Evaluación del número de garrapatas y pulgas

Las evaluaciones de los parásitos en los perros se realizaron 48 después del primer tratamiento y después de cada re-infestación, como se indica en la tabla 1.

El recuento de pulgas en cada perro se realizó peinando hasta que no se recuperó ninguna pulga durante al menos 5 minutos y se registró el número de pulgas vivas. Las garrapatas en el perro se contaron palpando, retirándolas de donde estaban adheridas y se clasificaron de acuerdo con las categorías indicadas en la Tabla 2.

TABLA 2

Categorías de garrapatas

Categoría	Descubrimientos generales	Estado de adhesión	Efecto
1	Viva	Libre	No
2	Viva	Adherida-no hinchada	No (excepto garrapatas individuales)
3	Viva	Adherida-hinchada	No (excepto garrapatas individuales)
4	Muerta	Libre	Sí
5	Muerta	Adherida- no hinchada	Sí
6	Muerta	Adherida- hinchada	No (excepto garrapatas individuales)

Evaluación de los síntomas clínicos

Durante el comportamiento y estado habituales diarios.

ES 2 315 740 T3

Cálculo de eficacia

El cálculo de eficacia se basó en medias aritméticas del número de garrapatas /pulgas en perros tratados comparado con el grupo de control. Para el cálculo de eficacia (%), se usa la siguiente fórmula (de acuerdo con la fórmula de Abbott):

$$\text{Eficacia} = 100 \times (\text{mc} - \text{mt}) / \text{mc}$$

Grupo de control (mc): número medio de pulgas vivas en el animal huésped número medio de garrapatas vivas en el animal huésped

Grupo de tratamiento (mt): número medio de pulgas vivas en el animal huésped número medio de garrapatas vivas (categoría 1-3) o muertas, hinchadas (categoría 6) en el animal huésped

Resultados

Las eficacias calculadas se reflejan a continuación en la tabla (Tabla 3).

TABLA 3

Eficacia del tratamiento con combinación del Compuesto 22c y Espinosad

<i>Día</i>	<i>GRUPO A</i>		<i>GRUPO B (control)</i>	
	<i>Garrapatas</i>	<i>Pulgas</i>	<i>Garrapatas</i>	<i>Pulgas</i>
d+2	99,3	100	0	0
d+5	99,3	100	0	0
d+7	95,7	100	0	0
d+9	100	100	0	0
d+12	99,6	100	0	0
d+14	99,6	100	0	0
d+16	99,6	100	0	0
d+19	99,7	100	0	0
d+21	100	100	0	0
d+23	100	100	0	0
d+26	100	100	0	0
d+28	99,4	100	0	0

De estos resultados se puede concluir que el tratamiento combinado con el Compuesto 22c y Espinosad dio como resultado una eficacia extraordinaria contra garrapatas así como contra pulgas.

Ejemplo 2

Valoración de dosis de (combinación de) compuesto 22c y Espinosad

Se usó un modelo *in vitro* para evaluar el compuesto 22c, espinosad y una combinación de los mismos para actividad acaricida a diversas concentraciones cuando los ingería el parásito. El sistema de ensayo es la ninfa no alimentada (3ª fase) de *Ornithodoros moubata* (garrapata blanda).

ES 2 315 740 T3

Preparación de las soluciones de ensayo

Se disolvieron los compuestos de ensayo en DMSO/Emulsogen (preparación convencional) y sangre de oveja desfibrinada como sigue:

20 µl DMSO + 980 µl de sangre:	1 mg de compuesto 22c
	1 mg de Espinosad
	1 mg de 22c más 1 mg de Espinosad (1 + 1)
	1 mg de compuesto 22c más 2 mg de Espinosad (1 + 2)
40 µl DMSO + 960 µl de sangre:	1 mg de compuesto 22c más 4 mg de Espinosad (1 + 4)
	1 mg de compuesto 22c más 6 mg de Espinosad (1 + 6)

Se añadió la sangre de oveja desfibrinada a las preparaciones de compuesto-DMSO y se mezcló completamente. Se prepararon concentraciones de ensayo apropiadas por diluciones de esta solución de partida de 1000 ppm en sangre de oveja desfibrinada. Las diluciones se mezclaron completamente y se prepararon justo antes del procedimiento de suministro.

La actividad específica se determina en un intervalo de dilución de concentraciones.

Procedimiento de alimentación

Para cada concentración, se alimentaron al menos 20 ninfas de *O. moubata* (fase III) a través de una membrana de parafilm sobre 2 ml de sangre de oveja desfibrinada complementada con el compuesto de ensayo a las concentraciones apropiadas y se calentaron a 38-40°C. El suministro se completó después de aproximadamente 30 minutos. Los organismos de ensayo se transfirieron posteriormente a placas Petri y se incubaron a 27-29°C y aproximadamente un 80% de humedad relativa durante hasta cuatro semanas.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

- alimentación (aceptación de la dieta)
- fenotipo (daño morfológico, comportamiento)
- defectos de desarrollo (muda)
- mortalidad

Evaluación

La actividad se evaluó por mortalidad (%) e inhibición del desarrollo en la fase IV ninfa: Se controló la alimentación durante el procedimiento de alimentación de la garrapata. Se evaluaron el fenotipo y la mortalidad de 20 ninfas hinchadas durante y después de la alimentación, 24 horas después de la alimentación y aproximadamente 28 días después de la alimentación. La mortalidad se expresa en porcentaje en relación a un control sin medicar. Los porcentajes de reflejan en la tabla 4.

De la tabla 4 puede verse que ambos compuestos se atribuyen al efecto antiparasitario de la mezcla. Las mezclas son todavía activas a bajas concentraciones para el compuesto 22C en la mezcla, que el compuesto 22c (y espinosad) solo.

Tabla 4: Valoración de dosis para 22c, espinosad, y mezclas de los mismos

	Intervalo de dilución de la solución de partida	1:1 (solución de partida)	1:2	1:5	1:10	1:20	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:5000
	Compuesto(s) (soluciones de partida)										
1	22c: 0 ppm SP: 50 ppm	100	95	85	45	30	10	5	5	5	5
2	22c: 50 ppm SP: 0 ppm	100	100	100	100	20	10	10	5	5	0
3	22c: 50 ppm SP: 50 ppm	100	100	100	100	100	100	50	15	0	0
4	22c: 50 ppm SP: 100 ppm	100	100	100	100	100	100	55	10	0	0
5	22c: 50 ppm SP: 200 ppm	100	100	100	100	100	100	75	50	15	0
6	22c: 50 ppm SP: 300 ppm	100	100	100	100	100	100	90	35	30	10
7	Control (solo sangre)	0	10	0	5	0	0	5	0	0	5
8	Control del disolvente: sangre más DMSO/Emulsogen	5	0	0	0	5	10	5	0	0	0

ES 2 315 740 T3

Ejemplo 3

Eficacia de Espinosad solo en el control de garrapatas (ejemplo comparativo)

5 El experimento se realizó esencialmente en el mismo entorno que en el experimento descrito en el Ejemplo 1. El grupo A consistía en dos perros, tratados con Espinosad solo contra la infestación por garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*). En el grupo A, se trató un perro con 50 mg de Espinosad por kg de peso corporal (pc), y el otro perro se trató con 15 mg de Espinosad por kg pc.

10 Los dos perros en el grupo B sirvieron como control sin tratar.

La planificación para el experimento se indica en la Tabla 5, y los resultados se indican en la Tabla 6:

15 TABLA 5

Esquema de infestación, tratamiento y evaluación (sólo Espinosad)

Día	Infestación	Evaluación	Tratamiento
	garrapatas		Espinosad
d-2	80		
d-1			
D0			50 o 15 mg/kg
D1			
D2		X	
D3	80		
D4			
D5	80	X	
D6			
D7		X	

Resultados

45 TABLA 6

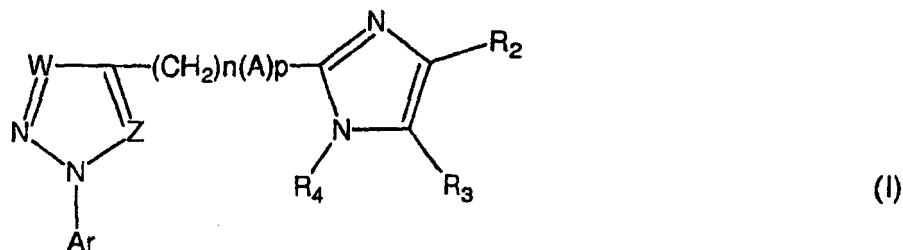
Eficacia de tratamiento contra garrapatas con Espinosad

Día	GRUPO A		GRUPO B (CONTROL)
	50 mg/kg	15 mg/kg	
d+2	96,9	60,9	0
d+5	62,5	0	0
d+7	62,6	0	0

Los resultados demuestran que el tratamiento de 1 semana con 15 mg/kg de espinosad era insuficiente para controlar las garrapatas, mientras que el tratamiento con 50 mg/kg de espinosad no era suficiente para evitar la reinfestación con garrapatas.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación antiparasitaria **caracterizada** porque comprende, como ingredientes activos, espinosita o espinosinas en combinación con un compuesto de fórmula (I)



y sales de los mismos, en la que

Ar es 2,6-dicloro-4-trifluorometilfenilo o 2-nitro-4-trifluorometilfenilo;

A es $S(O)_m$, $-CH=CH-$, O o NH;

W es N y Z es CR^5 ; o W es CR^1 y Z es N o CR^5 ;

R^1 es hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, halógeno o $R^{20}S(O)_q$;

R^2 y R^3 son hidrógeno, alquilo, alqueno o alquino, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido, arilo, ciano, halógeno, nitro, YR^{20} , $S(O)_2NR^8R^9$, CHO, NR^8R^9 , o $CYNR^8R^9$, R^4 es hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, acilo u alcocarbonilo opcionalmente sustituido;

R^5 es hidrógeno, alquilo, amino opcionalmente sustituido o halógeno;

R^8 y R^9 son iguales o diferentes y son hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, acilo o arilo;

R^{20} es alquilo opcionalmente sustituido;

Y es O o S;

m es 0, 1 o 2;

p es 0 o 1;

n es 0, 1 o 2 y;

q es 0, 1 o 2;

y en la que a) cualquier grupo alquilo, alcoxi y alquiltio es de 1 a 4 átomos de carbono; b) cualquier grupo alqueno o alquino es de 2 a 5 átomos de carbono; c) cualquier grupo sustituido alquilo, alcoxi, alquiltio, alqueno o alquino está sustituido con uno o más grupos iguales o diferentes seleccionados entre halógeno, YR^{20} , dihalociclopropilo, ciano, nitro, amino opcionalmente sustituido, aciloxi y arilo; d) cualquier grupo arilo es fenilo, opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo, haloalquilo, alcoxi, haloalcoxi, alquiltio, haloalquiltio, haloalquilsulfonilo, ciano o nitro; e) cualquier grupo acilo es alcanoilo de 1 a 4 átomos de carbono, o alquilsulfonilo o haloalquilsulfonilo; y f) cualquier grupo amino sustituido opcionalmente es de fórmula NR^8R^9 , con la condición de que cuando W es CR^1 y Z es CR^5 y n y p son ambos 0, R^4 no es alquilo

2. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizada** porque el compuesto de fórmula (I) es 5-cloro-1-(2,6-dicloro-4-trifluorometilfenil)-4-(4,5-diciano-1H-imidazol-2-il-3-metil-1H-pirazol (compuesto 22c).

3. La formulación de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 **caracterizada** porque las espinosinas son una mezcla de cualquiera de dos más compuestos de espinosina.

4. La formulación de acuerdo con la reivindicación 3 **caracterizada** porque la mezcla es espinosad.

5. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 **caracterizada** porque el compuesto de fórmula (I) y una o más espinosinas están presentes en una proporción de 1:10 a 10:1.

ES 2 315 740 T3

6. El uso de una o más espinosinas y al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como ingredientes activos en la fabricación de un medicamento para controlar una infestación ectoparásita administrando los ingredientes activos en combinación, o simultáneamente o secuencialmente.

5 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 en el que los ingredientes activos son 5-cloro-1-(2,6-dicloro-4-trifluorometilfenil)-4-(4,5-diciano-1H-imidazol-2-il-3-metil-1H-pirazol) y espinosad.

10 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que el medicamento es para controlar una infestación ectoparásita administrando los ingredientes activos simultáneamente.

10 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el medicamento comprende los ingredientes activos en una preparación individual.

15 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que los ectoparásitos son garrapatas.

15 11. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que los ectoparásitos son pulgas.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65