

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 348**

51 Int. Cl.:

A61P 31/12 (2006.01)
A61P 33/00 (2006.01)
A61P 33/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2006 E 06755932 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 1883452**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende un agente antiparasitario y una sustancia activa elegida entre timol, eugenol y carvacrol**

30 Prioridad:

13.05.2005 WO PCT/IB2005/001314

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

27.03.2013

73 Titular/es:

**ASD (ADVANCED SCIENTIFIC DEVELOPMENTS)
(100.0%)
10 RUE LOUKSOUS QUARTIER EL HANA
20200 CASABLANCA, MA**

72 Inventor/es:

REMMAL, ADNANE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 399 348 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que comprende un agente antiparasitario y una sustancia activa elegida entre timol, eugenol y carvacrol.

5 La invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende dos sustancias terapéuticamente activas una de las cuales ejerce una acción de potenciación sobre la otra, así como a la utilización de esta composición.

Es sabido que la eficacia de los agentes terapéuticos depende de las dosis utilizadas, lo que obliga, en el caso de resistencias parciales a aumentar las dosis de los agentes terapéuticos para alcanzar la eficacia buscada. Este aumento de la dosis lleva a problemas de aparición de efectos secundarios indeseables y de toxicidad aguda o crónica, que pueden complicar considerablemente el estado de los pacientes tratados.

10 Esta resistencia parcial puede llegar a ser una resistencia total. En este caso, el aumento de las dosis ya no tiene ningún efecto terapéutico beneficioso, sólo se observan los efectos tóxicos. El tratamiento consiste entonces en cambiar el agente terapéutico.

Esta cascada se puede repetir y llevar a la situación más grave: la resistencia total a múltiples agentes terapéuticos (resistencia a multi-fármacos).

15 Así, en particular, los enfermos inmunodeprimidos, se vuelven cada vez más difíciles de tratar y por tanto su esperanza de vida se reduce. Además, su calidad de vida se ve grandemente afectada por la administración de dosis altas de agentes terapéuticos.

20 La invención tiene por objeto paliar estos problemas proponiendo asociar al menos dos sustancias terapéuticamente activas, una de las cuales potencia la actividad de la otra, lo que permite no solamente bajar las dosis de cada sustancia terapéuticamente activa sino también tratar a los pacientes que sufren infecciones de gérmenes resistentes. A este efecto, la invención propone una composición farmacéutica caracterizada porque comprende:

- al menos una primera sustancia terapéuticamente activa elegida entre timol, eugenol, carvacrol y los isómeros y mezclas de éstos, y

- al menos una segunda sustancia terapéuticamente activa que es un antiparasitario.

25 La primera sustancia terapéutica se puede obtener por síntesis química o a partir de una fuente vegetal.

El antiparasitario que forma parte de la composición de la invención se elige entre los protozoocidas y sus mezclas.

30 Los antiparasitarios conocidos son salinomicina, niclosamida, praziquantel o isoquinoleína, albendazol, fubendazol, mebendazol, tiabendazol, triclabendazol, bitionol, dietilcarbamazina, ivermectina, levamisol, metrifonato, niclofan, oxamniquina, una piperazina, pirantel, pirvinio, metronidazol, nivorazol, ornidazol, secnidazol, tinidazol, meglumina antimoniató, pentamidina isetonato, estibogluconato de sodio, benznidazol, difluorometilornitina (DFMO), melarsoprol, nifurtimox, suramina sódica, amodiaquina, artemisina, artesunato y sus derivados, cloroquina, doxiciclina, halofantrina, mefloquina, primaquina, proguanil, pironaridina, quinina, atovacuona, azitromicina, claritromicina, clindamicina, cotrimoxazol, dapsona, deshidroemetina, paromomicina, pirimetamina, espiamicina, sulfadiazina, tenonitrozol, tiliquinol trimetoprim, trimetrexato, y sus derivados y mezclas.

35 Una composición antiparasitaria particularmente preferida es una composición en la que la primera sustancia terapéuticamente activa es el timol y el antiparasitario es la salinomicina.

Otra composición antiparasitaria particularmente preferida es una composición antiparasitaria en la que dicha primera sustancia terapéuticamente activa es el carvacrol y el antiparasitario es la salinomicina.

40 Todavía más, otra composición particularmente preferida es una composición antipalúdica en la que dicha primera sustancia terapéuticamente activa se elige entre el carvacrol y el eugenol, y el antiparasitario es un antipalúdico elegido entre mefloquina, cloroquina, y artesunato, y las mezclas de éstos.

La invención propone igualmente un kit caracterizado porque contiene:

45 al menos un primer recipiente que contiene una primera sustancia terapéuticamente activa elegida entre timol, eugenol, carvacrol y los isómeros y mezclas de éstos, y al menos un segundo recipiente que contiene una segunda sustancia terapéuticamente activa que es un antiparasitario.

La invención propone también un tratamiento de una afección debida a un parásito, caracterizado porque se administra a un paciente que sufre una afección debida a un parásito, de manera simultánea o secuencial al menos una primera sustancia terapéuticamente activa elegida entre timol, eugenol, carvacrol y los isómeros y mezclas de éstos, y al menos una segunda sustancia terapéuticamente activa que es un agente antiparasitario.

En este método, con preferencia, se administra de manera simultánea o secuencial, a un paciente que sufre una afección debida a un parásito entre 10 y 100 mg/kg de peso del paciente/día de dicha primera sustancia terapéuticamente activa, y entre 20 y 100 mg/kg de peso del paciente/día de dicha segunda sustancia terapéuticamente activa que es un antiparasitario.

- 5 Con preferencia, en este método, dicha primera sustancia terapéuticamente activa se elige entre carvacrol, eugenol y timol y dicha segunda sustancia terapéuticamente activa es la salinomicina.

10 La invención propone igualmente un tratamiento del paludismo caracterizado porque se administra a un paciente afectado de paludismo, de manera simultánea o secuencial, al menos una primera sustancia terapéuticamente activa elegida entre eugenol o carvacrol, y al menos una segunda sustancia terapéuticamente activa que es un antipalúdico elegido entre mefloquina, artesunato, cloroquina y sus mezclas.

La invención se entenderá mejor y otros fines y ventajas de la misma aparecerán más claramente tras la lectura de la descripción explicativa que sigue.

La composición farmacéutica de la invención comprende como primera sustancia terapéuticamente activa el timol, el eugenol, el carvacrol, y sus isómeros así como sus mezclas.

- 15 Estas sustancias deben ser puras.

Estos compuestos tienen propiedades antimicrobianas bien conocidas por sí mismas.

El timol, el eugenol y el carvacrol, se encuentran en proporciones variadas en diferentes extractos de plantas aromáticas, es decir que se pueden purificar a partir de estas plantas. Sin embargo, se pueden obtener muy fácilmente por síntesis química.

- 20 Ahora bien, los inventores han descubierto ahora que estos compuestos tienen un efecto de potenciación sobre numerosas sustancias terapéuticamente activas entre ellas los agentes antiparasitarios conocidos y ya utilizados como medicamentos específicos de esta especialidad.

25 La segunda sustancia terapéuticamente activa comprendida en la composición farmacéutica de la invención es por tanto un antiparasitario, que ya es conocido como tal y que ya se utiliza como medicamento específico de esta especialidad, y cuya actividad se potencia.

Los antiparasitarios conocidos y ya utilizados como medicamento específico de esta especialidad que se utilizan en la composición farmacéutica de la invención, y cuyo efecto será potenciado por la primera sustancia pura terapéuticamente activa, pertenecen a la familia de los protozoocidas.

- 30 La familia de los anthelmínticos comprende los cestocidas tales como niclosamida y praziquantel, los bencimidazoles tales como albendazol, flubendazol, mebendazol, tiabendazol, triclabendazol, y otros anthelmínticos, tales como bitionol, dietilcarbamazina, ivermectina, levamisol, metrifonato, niclofan, oxamniquina, piperazina, pirantel, pirvinio.

35 La familia de los protozoocidas comprende la serie de los 5-nitro-imidazoles, metronidazol, nimorazol, ornidazol, secnidazol, tinidazol, los leishmanocidas, tales como meglumina antimoniato, pentamidina isetionato, estibogluconato de sodio, los tripanosomicidas, tales como benznidazol, difluorometilornitina (DFMO), melarsoprol, nifurtimox, suramina sódica, los antipalúdicos, tales como amodiaquina, artemisina, cloroquina, doxiciclina, halofantrina, mefloquina, primaquina, proguanil, pironaridina, quinina, artesunato. Otros protozoocidas son salinomicina, atovacuona, azitromicina, claritromicina, clindamicina, cotrimoxazol, dapsona, deshidroemetina, paromomicina, pirimetamina, espiramicina, sulfadiazina, tenonitrozol, tiliquinol trimetoprim, trimetrexato.

Se pueden utilizar estos compuestos solos, o en combinación uno con otro.

- 40 La invención tal como se reivindica se refiere a la salinomicina, la mefloquina, la cloroquina y el artesunato utilizados en combinación con el carvacrol, el eugenol y/o el timol.

Aparte de la presente invención, teniendo en cuenta el efecto potenciador ejercido por la primera sustancia terapéuticamente activa definida en la invención, se podrían utilizar igualmente con éxito otros agentes antiparasitarios conocidos o venideros.

- 45 La composición farmacéutica según la invención se puede formular bajo una forma adaptada para una administración simultánea o secuencial de las mencionadas al menos primera y segunda sustancias terapéuticamente activas.

La forma galénica de la composición farmacéutica de la invención será adaptada para su utilización.

Por ejemplo, podrá ser utilizada bajo la forma de solución, de suspensión, de sellos u otros.

Las composiciones para administración parenteral son generalmente soluciones o suspensiones estériles farmacéuticamente aceptables que eventualmente se pueden preparar extemporáneamente en el momento del empleo.

5 Para la preparación de soluciones o de suspensiones no acuosas, se pueden utilizar aceites vegetales naturales tales como aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de parafina o los ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Las soluciones estériles acuosas pueden estar constituidas por una solución de las sustancias terapéuticamente activas en el agua. Las soluciones acuosas son adecuadas para la administración intravenosa en la medida en que el pH sea convenientemente ajustado y en que se alcance la isotonicidad, por ejemplo con ayuda de una cantidad suficiente de cloruro de sodio o de glucosa.

10 En efecto, teniendo en cuenta la estructura química de los antiparasitarios, y por otra parte, vista la estructura química del carvacrol, del timol y del eugenol, se piensa, pero sin querer estar vinculados a esta teoría, que el carvacrol, el timol, el eugenol y sus isómeros y mezclas, interactúan con los antiparasitarios, para formar complejos que tienen una estructura que se difunde más fácilmente en los líquidos fisiológicos del organismo y que se difunde más fácilmente en el citoplasma de las células infectadas dianas.

15 Pero se ha demostrado que cuando los diferentes elementos de la composición farmacéutica de la invención se mezclan en presencia de detergentes tales como el Tween o el Triton o de disolventes tales como el etanol y el DMSO (dimetilsulfóxido), las moléculas activas de la primera y de la segunda sustancia terapéuticamente activa se asocian con las moléculas de detergentes y de disolventes y no forman el complejo de potenciación.

20 Ahora bien se ha descubierto que el complejo de potenciación se forma cuando se utiliza una suspensión acuosa de agar, como medio de dispersión por viscosidad.

Así, la composición farmacéutica de la presente invención se preparará con preferencia sin detergentes y sin disolventes. Por ejemplo, se pondrá en suspensión acuosa que se ha vuelto viscosa por el agar a una concentración no gelificante, por ejemplo de 1 a 5 gramos de agar por litro de suspensión.

25 La composición farmacéutica de la invención permite tratar infecciones localizadas o sistémicas de gérmenes resistentes con dosis más débiles de cada una de las mencionadas primera y segunda sustancias terapéuticamente activas que las dosis necesarias para el tratamiento de las mismas infecciones de gérmenes sensibles, por una u otra de estas mismas dichas primera y segunda sustancias terapéuticamente activas solas.

30 En efecto la composición de la invención permite utilizar dosis de dicha primera sustancia terapéuticamente activa, cuando está en combinación con dicha segunda sustancia terapéuticamente activa, alrededor de tres veces inferiores a las necesarias cuando dicha primera sustancia terapéuticamente activa se utiliza sola y dosis de dicha segunda sustancia terapéuticamente activa, cuando está en combinación con dicha primera sustancia terapéuticamente activa, de 2 a 10 veces inferiores a las necesarias cuando dicha segunda sustancia terapéuticamente activa se utiliza sola.

Esto tiene como consecuencia el ofrecer un tratamiento que presenta las siguientes ventajas:

- 35
- eficacia contra los gérmenes sensibles con dosis muy bajas,
 - eficacia contra los gérmenes resistentes a un agente terapéutico,
 - eficacia contra los gérmenes resistentes a varios agentes terapéuticos,
 - lucha contra los fenómenos de recidiva,
 - lucha contra los fenómenos de selección de gérmenes resistentes,
- 40
- en todos estos casos, disminución de los riesgos de toxicidad y/o de aparición de efectos secundarios indeseables, bien conocidos por los expertos en la técnica, mediante la administración de dosis muy bajas.

Además, se produce una disminución del coste de producción del tratamiento teniendo en cuenta la baja cantidad de principios activos utilizados.

45 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden presentar bajo la forma de liposomas o bajo la forma de asociación con soportes tales como las ciclodextrinas o los polietilenglicoles.

Las composiciones farmacéuticas de la invención representan un medio sencillo y eficaz para luchar contra los problemas ligados a los agentes microbianos en general que son esencialmente la resistencia a los agentes terapéuticos y la toxicidad de éstos generada por la utilización de dosis altas.

50 En efecto, el timol, el eugenol, el carvacrol, y sus mezclas e isómeros, son moléculas sencillas que no han sido nunca descritas como poseedoras de ninguna toxicidad y su adición que tiene un efecto potenciador sobre la

segunda sustancia terapéuticamente activa permite utilizar dosis mucho más bajas de esta segunda sustancia terapéuticamente activa.

5 El procedimiento de tratamiento de los pacientes que sufren una afección parasitaria consistirá por tanto, en una primera variante, en administrar a estos pacientes la dosis determinada por el médico de la composición farmacéutica de la invención que contenga las dosis apropiadas de dicha al menos una primera sustancia terapéuticamente activa, combinadas con las dosis apropiadas de dicha al menos una segunda sustancia terapéuticamente activa, es decir el antiparasitario apropiado.

10 En una segunda variante, el procedimiento de tratamiento de los pacientes que sufren una afección parasitaria consistirá en administrar a estos pacientes secuencialmente la dosis determinada por el médico de dicha al menos una primera sustancia terapéuticamente activa, y después la dosis apropiada de dicha al menos una segunda sustancia terapéuticamente activa, es decir el antiparasitario apropiado o a la inversa.

A este efecto, la invención propone un kit que contiene, al menos un primer recipiente que contiene una de dichas primeras sustancias terapéuticamente activas, y al menos un segundo recipiente que contiene una de dichas segundas sustancias terapéuticamente activas.

15 Este kit permitirá al personal encargado de preparar a petición una mezcla, en las dosis apropiadas, de la primera o primeras sustancias terapéuticas deseadas y del antiparasitario o antiparasitarios deseados, para una administración simultánea, o de administrar secuencialmente y de forma separada la dosis apropiada de dicha al menos una primera sustancia terapéuticamente activa, y después la dosis apropiada de dicha al menos una segunda sustancia terapéuticamente activa, es decir el antiparasitario apropiado, o a la inversa.

20 Sin embargo, es preferible utilizar una mezcla para utilización simultánea para permitir que se forme el complejo de potenciación y realizar inmediatamente después la administración al paciente.

Para comprender mejor la invención, se van a describir ahora, a modo de ejemplos puramente ilustrativos y no limitativos, varios modos de realización.

Ejemplos

25 Ejemplo 1: Tratamiento de la coccidiosis en los pollos, con salinomicina potenciada por el carvacrol o el timol.

Estos ensayos son ensayos *in vivo* que han consistido en determinar la ganancia de peso, el índice de consumo, la excreción diaria de oocistos y el aspecto de las materias fecales en los pollos tratados.

30 El experimento se llevó a cabo sobre una muestra de 200 pollos de 22 días de edad (peso 620 g de media) que tenían una coccidiosis subclínica proveniente de una banda de 10.000 pollos de carne. La coccidiosis subclínica fue diagnosticada el 20^o día. La excreción de oocistos en los animales de la muestra era del orden de 50.000 oocistos/g (OPG) de media.

El análisis microscópico reveló la existencia de dos especies de *Eimeria*: *Eimeria acervulina* y *Eimeria tenella*.

35 El antiparasitario ensayado es la salinomicina que forma parte de los agentes antiparasitarios más utilizados para este género de afección. Se fabricaron dos composiciones farmacéuticas antiparasitarias según la invención mezclando la salinomicina a diferentes concentraciones, con el carvacrol o con el timol a una concentración infra-inhibidora de 75 mg/kg de alimento.

40 La actividad antiparasitaria se ensayó igualmente con la salinomicina sola, con el carvacrol solo o con el timol solo. La actividad antiparasitaria se midió por la determinación de criterios utilizados clásicamente en este género de afección que son: la ganancia de peso, el índice de consumo, la excreción diaria de oocistos y el aspecto de las materias fecales. Estos criterios se anotaron el quinto día (justo después del fin del tratamiento) y el decimoquinto día (diez días después del fin del tratamiento).

Se dividió la muestra en 7 lotes de 28 pollos cada uno:

Lote 1: Animales no infectados y no tratados (testigos sanos) con un peso el 22^o día: 750 g de media.

Lote 2: Animales infectados no tratados (testigo de afección).

45 Lote 3: Animales infectados tratados con salinomicina a una dosis de 40 mg/kg de alimento.

Lote 4: Animales infectados tratados con carvacrol a 75 mg/kg de alimento.

Lote 5: Animales infectados tratados con timol a 75 mg/kg de alimento.

Lote 6: Animales infectados tratados con la salinomicina a una concentración de 40 mg/kg de alimento potenciada con el carvacrol a una concentración de 75 mg/kg de alimento.

Lote 7: Animales infectados tratados con la salinomicina a una concentración de 40 mg/kg de alimento potenciada con el timol a una concentración de 75 mg/kg de alimento.

El alimento utilizado es un alimento industrial (acabado) que no contenía ningún agente antiparasitario.

5 Los agentes antiparasitarios utilizados se mezclaron con este alimento durante los cinco días de tratamiento. Los animales tuvieron acceso libre al alimento durante todo el experimento.

La tabla 1 que sigue da los resultados del ensayo que compara la acción de las composiciones según la invención con respecto a la salinomicina sola, al carvacrol solo y al timol solo.

Tabla 1

	Ganancia de peso (gramos ± ESM)		Índice de consumo		Secreción de oocistos (OPG ± ESM)		Aspecto de los excrementos	
	5 días	15 días	5 días	15 días	5 días	15 días	5 días	15 días
Lote 1	250 ± 24	1000 ± 70	1,62	1,82	1200 ± 158	1500 ± 115	normal	normal
Testigos no infectados no tratados								
Lote 2	168 ± 42	780 ± 97	2,3	3,1	92.000 ± 5.500	194.000 ± 7.800	diarreico	diarreico
Testigos infectados no tratados								
Lote 3	182 ± 28	835 ± 44	2,2	2,9	110.000 ± 6.700	164.000 ± 7.200	diarreico	diarreico
Tratamiento con salinomicina (40 mg/kg de alimento)								
Lote 4	176 ± 32	812 ± 51	2,4	3	105.000 ± 5.900	147.000 ± 4.300	diarreico	diarreico
Tratamiento con carvacrol solo (75 mg/kg de alimento)								
Lote 5	180 ± 52	840 ± 45	2,45	3,3	98.000 ± 4.200	136.000 ± 6.500	diarreico	diarreico
Tratamiento con timol solo (75 mg/kg de alimento)								
Lote 6	230 ± 33	1120 ± 45	1,65	1,72	7.240 ± 650	5.400 ± 340	normal	normal
Salinomicina (SAL-P) (40 mg/kg) + carvacrol (75 mg/kg)								
Lote 7	220 ± 41	1085 ± 56	1,70	1,78	9.300 ± 570	6.200 ± 450	normal	normal
Salinomicina (SAL-P) (40 mg/kg) + timol (75 mg/kg)								

En la tabla 1 se muestra claramente que las composiciones según la invención tienen una acción antiparasitaria notable sobre las dos cepas de *Eimeria* estudiadas en comparación con la salinomicina sola y con el carvacrol solo o con el timol solo.

5 En efecto, la potenciación de la salinomicina por el carvacrol y el timol permite obtener *in vivo* resultados sorprendentes en cuanto al aumento importante de la actividad antiparasitaria de la salinomicina.

En efecto, todos los animales infectados tratados con la salinomicina sola, con el carvacrol solo, o con el timol solo continúan diarreicos quince días después del fin del tratamiento y su ganancia de peso es muy débil en relación al lote de pollos testigos no infectados y no tratados.

10 En cambio, cuando los animales han sido tratados con las composiciones de la invención, su ganancia de peso, índice de consumo y aspecto de los excrementos son equivalentes a esos mismos criterios en los testigos no infectados y no tratados.

Ejemplo 2: Acción antipalúdica propia del eugenol y del carvacrol y potenciación del artesunato.

Ensayo *in vitro*: Determinación de la CI50 (concentración capaz de provocar una inhibición de crecimiento del 50 % del parásito)

15 El experimento se llevó a cabo con cuatro clones de *Plasmodium falciparum* agente del paludismo; enfermedad parasitaria llamada también Malaria. Estos clones se llaman 3d7, HB3, Dd2 y 7G8. Estos clones representan modelos de referencia de laboratorio utilizados normalmente para ensayar la actividad antipalúdica de los fármacos.

20 El *Plasmodium falciparum* se cultiva sobre glóbulos rojos humanos. El ensayo se realiza sobre placas de 96 pocillos en los que los glóbulos rojos con parásitos (sincronizados con sorbitol) se ponen en contacto con los diferentes tratamientos durante 72 horas a 37 °C en una estufa con atmósfera controlada (5 % de CO₂, 1 % de O₂ y 94 % de N₂). El crecimiento del agente patógeno se mide por la determinación de la cantidad de su ADN fluorescente en presencia de SybrGreen.

25 El antiparasitario ensayado es el artesunato, que forma parte de los agentes antiparasitarios más eficaces. Una composición farmacéutica antiparasitaria según la invención ha sido fabricada mezclando artesunato a diferentes concentraciones, con el carvacrol o con el eugenol a concentraciones infra-inhedoras respectivas de 0,05 mM y 0,2 mM. Estas concentraciones son dos a seis veces más débiles (según el clon) que la CI50 del carvacrol solo y del eugenol solo. Esta composición farmacéutica se anota como Artesunato P eugenol, o artesunato P carvacrol. La letra P significa potenciada por el eugenol o por el carvacrol.

30 En cada caso, la actividad antiparasitaria se ha ensayado con el artesunato, con el carvacrol solo, con el eugenol solo o con la composición según la invención.

La CI50 se determina por el programa HN NonLin V1.051Beta software de Harald Noedl basándose en los valores obtenidos por fluorescencia.

La tabla 2 y la tabla 3 que siguen dan los resultados de los ensayos que miden la CI50 de las diferentes composiciones:

35

Tabla 2

Clones de <i>Plasmodium falciparum</i> en crecimiento	CI50 Artesunato solo nM	CI50 Composición según la invención Artesunato P carvacrol (nM de artesunato)	CI50 Carvacrol solo mM
Clon 3d7	2,14	1,025	0,33
Clon HB3	2,28	1,15	0,22
Clon Dd2	2,66	1,25	0,16
Clon 7G8	1,00	0,47	0,11

Tabla 3

Clones de <i>Plasmodium falciparum</i> en crecimiento	CI50 Artesunato solo nM	CI50 Composición según la invención Artesunato P eugenol (nM de artesunato)	CI50 Eugenol solo mM
Clon 3d7	2,14	1,025	1,25
Clon HB3	2,28	1,15	0,66
Clon Dd2	2,66	1,25	0,66
Clon 7G8	1,25	0,50	0,40

En las tablas 2 y 3 se muestra claramente que el carvacrol y el eugenol tienen una actividad antipalúdica notable propia de los mismos a concentraciones bastante débiles.

- 5 En las tablas 2 y 3 se muestra también que la composición según la invención tiene una acción antipalúdica notable sobre estos clones de sensibilidad variable en comparación con el artesunato solo o con el carvacrol o el eugenol solos a las concentraciones infra-inhedoras utilizadas en este ensayo.

10 En efecto, se constata que utilizando una concentración 0,05 mM de carvacrol y 0,2 mM de eugenol esto es concentraciones alrededor de 2 a 6 veces inferiores a la CI50 del carvacrol solo o del eugenol solo, la concentración en artesunato que permite obtener el 50 % de inhibición se reduce prácticamente a la mitad.

Se debe observar que la acción antipalúdica del artesunato potenciado según la invención no es más que dos veces mejor que la del artesunato solo en este ejemplo pues los cuatro clones son ya sensibles al artesunato solo. A pesar de esto, la potenciación ha permitido doblar la actividad antipalúdica.

Ejemplo 3: Acción antipalúdica propia del eugenol y potenciación de la cloroquina.

- 15 Ensayo *in vitro*: Determinación de la CI50 (concentración capaz de provocar una inhibición de crecimiento del 50 % del parásito).

El experimento se ha realizado con los mismos clones de *Plasmodium falciparum* que el ejemplo 2 (3d7, HB3, Dd2 y 7G8). Los dos primeros clones (3d7 y HB3) son sensibles y los otros dos (Dd2 y 7G8) son resistentes a la cloroquina.

- 20 El antiparasitario ensayado es la cloroquina, que forma parte de los agentes antiparasitarios más utilizados. Una composición farmacéutica antiparasitaria según la invención se ha fabricado mezclando la cloroquina a diferentes concentraciones, con el eugenol a una concentración infra-inhedoras 0,2 mM dos a seis veces (según los clones) inferior a la CI50 del eugenol solo. Esta composición farmacéutica se anota como cloroquina P eugenol. La letra P significa potenciada por el eugenol.

- 25 En cada caso, la actividad antiparasitaria se ha ensayado con la cloroquina sola, con el eugenol solo o con la composición según la invención.

El método de determinación de las CI50 utilizado es el mismo que para el ejemplo 2.

La tabla 4 que sigue da los resultados de los ensayos que miden la CI50 de las diferentes composiciones:

Tabla 4

CI50 <i>Plasmodium falciparum</i> en crecimiento	CI50 Cloroquina sola nM	CI50 Composición según la invención Cloroquina P eugenol (nM de cloroquina)	CI50 Eugenol solo mM
---	-------------------------------	--	----------------------------

CI50 <i>Plasmodium falciparum</i> en crecimiento	CI50 Cloroquina sola nM	CI50 Composición según la invención Cloroquina P eugenol (nM de cloroquina)	CI50 Eugenol solo mM
Clon 3d7	22,31	13,2	1,25
Clon HB3	37,07	15,3	0,66
Clon Dd2	493,84	12,5	0,66
Clon 7G8	445,17	12,20	0,40

En la tabla 4 se muestra claramente que el eugenol tiene una actividad antipalúdica notable que es propia del mismo a una concentración bastante débil.

5 En la tabla 4 se muestra también que la composición según la invención tiene una acción antipalúdica notable sobre estos clones de sensibilidad variable en comparación con la cloroquina sola o el eugenol solo.

En efecto, se constata que utilizando una concentración 0,2 mM de eugenol esto es una concentración alrededor de 2 a 6 veces inferior a la CI50 del eugenol solo, la concentración de cloroquina que permite obtener el 50 % de inhibición se reduce prácticamente a la mitad para los dos clones sensibles (3d7 y HB3) y casi 20 veces para los dos clones resistentes (Dd2 y 7G8).

10 Ejemplo 4: Acción antipalúdica propia del eugenol y potenciación de la mefloquina.

Ensayo *in vitro*: Determinación de la CI50 (concentración capaz de provocar una inhibición de crecimiento del 50 % del parásito).

15 El experimento se ha realizado con los mismos clones de *Plasmodium falciparum* que los ejemplos 2 y 3 (3d7, HB3, Dd2 y 7G8). Los dos primeros clones (3d7 y HB3) son sensibles y los otros dos (Dd2 y 7G8) son resistentes a la mefloquina.

20 El antiparasitario ensayado es la mefloquina, que forma parte de los agentes antiparasitarios más utilizados. Una composición farmacéutica antiparasitaria según la invención se ha fabricado mezclando la mefloquina a diferentes concentraciones, con el eugenol a una concentración infra-inhibidora 0,2 mM, dos a seis veces (según los clones) inferior a la CI50 del eugenol solo. Esta composición farmacéutica se anota como mefloquina P eugenol. La letra P significa "potenciada por el eugenol".

En cada caso, la actividad antiparasitaria se ha ensayado con la mefloquina sola, con el eugenol solo o con la composición según la invención.

El método de determinación de las CI50 utilizado es el mismo que para los ejemplos 2 y 3.

La tabla 5 que sigue da los resultados de los ensayos que miden la CI50 de las diferentes composiciones:

25 Tabla 5

CI50 <i>Plasmodium falciparum</i> en crecimiento	CI50 Mefloquina sola nM	CI50 Composición según la invención Mefloquina P eugenol nM de mefloquina	CI50 Eugenol solo mM
Clon 3d7	8,83	2,79	1,25
Clon HB3	8,96	3,48	0,66
Clon Dd2	33,75	3,6	0,66

Clon 7G8	15,32	2,67	0,40
----------	-------	------	------

En la tabla 5 se muestra claramente que el eugenol tiene una actividad antipalúdica notable que es propia del mismo a una concentración bastante débil.

5 En la tabla 5 se muestra también que la composición según la invención tiene una acción antipalúdica notable sobre estos clones de sensibilidad variable en comparación con la mefloquina sola o el eugenol solo.

En efecto, se constata que utilizando una concentración 0,2 mM de eugenol esto es una concentración alrededor de 2 a 6 veces inferior a la CI50 del eugenol solo, la concentración de mefloquina que permite obtener el 50 % de inhibición se reduce 3 veces para los dos clones sensibles (3d7 y HB3) y de 5 a 10 veces para los dos clones resistentes (Dd2 y 7G8).

10 Ejemplo 5: Acción antipalúdica propia del carvacrol y potenciación del artesunato

Ensayo *in vivo*:

15 En este ensayo, la actividad antipalúdica propia del carvacrol igual que la del artesunato potenciado por el carvacrol se ha estudiado *in vivo* sobre un modelo animal de malaria cerebral (neuropaludismo). Este modelo de referencia para este género de infección se realiza sobre ratones (CBA/J) infectados por Plasmodium berghei ANKA, agente del neuropaludismo.

La infección y el tratamiento se efectúan por vía intraperitoneal.

En este modelo, los animales comienzan a presentar los primeros signos clínicos desde el cuarto o quinto día (D4 o D5) después de la infección. Los animales que han presentado estos signos clínicos mueren en los dos días siguientes (D6, D7).

20 El ensayo ha constado de 5 lotes de 10 ratones organizados como sigue:

Lote 1: animales testigos infectados no tratados

Lote 2: animales infectados tratados con carvacrol (60 mg/kg de peso) dos veces al día con separación de 12 horas.

Lote 3: animales infectados tratados con carvacrol (40 mg/kg de peso) dos veces al día con separación de 12 horas.

Lote 4: animales infectados tratados con artesunato (40 mg par Kg de peso) una vez al día

25 Lote 5: animales infectados tratados con artesunato (40 mg par Kg de peso) una vez al día y con carvacrol (40 mg/kg de peso) dos veces al día.

Los tratamientos han comenzado el quinto día después de la infección (D5) y se han continuado durante tres días (D5, D6 y D7).

Los resultados se presentan en la siguiente tabla 6:

30

Tabla 6

	% de mortalidad	Duración de la vida de los animales muertos (días)	% de supervivientes el día 12
Lote 1 (testigo)	100	5,5	n.a.
Lote 2 (carvacrol 120)	20	7,5	80
Lote 3 (carvacrol 80)	100	7,5	n.a.
Lote 4 (artesunato 40)	100	7	n.a.
Lote 5 (artesunato 40 y carvacrol 80))	0	n.a.*	100

* n.a. = no aplicable

En la tabla 6 se muestra claramente que el carvacrol solo, administrado dos veces al día a la dosis de 60 mg por Kg de peso del animal es capaz de proteger al 80 % de los animales tratados. Esto demuestra la existencia de una actividad antipalúdica notable del carvacrol solo a la dosis utilizada (120 mg por Kg de peso cada 24 h).

ES 2 399 348 T3

Un tratamiento con carvacrol dos veces al día a 40 mg por kg no da protección pero permite prolongar ligeramente el tiempo de vida de los animales tratados, lo que demuestra una acción terapéutica parcialmente eficaz de este tratamiento a la dosis utilizada (80 mg por kg de peso cada 24 h).

5 El artesunato solo (40 mg por Kg de peso cada 2 4h) no protege ni prolonga más el tiempo de vida de los animales infectados, lo que significa una actividad terapéutica parcialmente eficaz.

La asociación del artesunato (40 mg por Kg) una vez al día con el carvacrol (40 mg por Kg) dos veces al día da una protección del 100 % de los animales más allá del tiempo durante el cual puede sobrevenir el neoplasma esto es más allá del día 12.

10 En estos resultados se muestra claramente que el carvacrol solo tiene una actividad antipalúdica notable a la dosis de (60 mg por Kg dos veces al día).

En estos resultados se muestra también claramente que la composición según la invención tiene una acción antipalúdica notable en comparación con el artesunato solo o el carvacrol solo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende:
 - al menos una primera sustancia terapéuticamente activa elegida entre el timol, el eugenol y el carvacrol, y
 - al menos una segunda sustancia terapéuticamente activa que es un antiparasitario elegido entre la salinomicina, el artesunato, la cloroquina y la mefloquina.
2. La composición según la reivindicación 1, caracterizada porque el antiparasitario es la salinomicina.
3. La composición según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha primera sustancia terapéuticamente activa se elige entre el carvacrol y el eugenol, y el antiparasitario se elige entre el artesunato, la mefloquina y la cloroquina.
4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque dicha primera y segunda sustancias terapéuticamente activas se ponen en suspensión en una solución acuosa de agar.
5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque no contiene detergentes ni disolventes.
6. Un kit caracterizado porque contiene:
 - al menos un primer recipiente que contiene una primera sustancia terapéuticamente activa elegida entre el timol, el eugenol y el carvacrol, y
 - al menos un segundo recipiente que contiene una segunda sustancia terapéuticamente activa que es un antiparasitario elegido entre la salinomicina, el artesunato, la cloroquina y la mefloquina.
7. El kit según la reivindicación 6, caracterizado porque el antiparasitario es la salinomicina.
8. El kit según la reivindicación 6, caracterizado porque dicha primera sustancia terapéuticamente activa se elige entre el carvacrol y el eugenol, y el antiparasitario se elige entre el artesunato, la mefloquina y la cloroquina.
9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el kit según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para utilización en el tratamiento de una afección debida a un parásito en un paciente.
10. La composición según la reivindicación 3 o el kit según la reivindicación 8, para utilización en el tratamiento del paludismo en un paciente.
11. La composición o el kit según la reivindicación 9 o 10, caracterizados porque las dosis a administrar son:
 - entre 10 y 100 mg/kg de peso del paciente/día para la primera sustancia terapéuticamente activa, y
 - entre 20 y 100 mg/kg de peso del paciente/día para la segunda sustancia terapéuticamente activa de dicha composición.