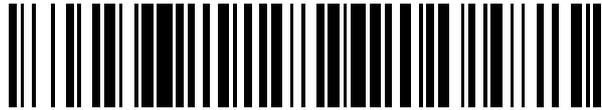


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 442**

51 Int. Cl.:

A01N 45/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2008 E 08781531 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 2176207**

54 Título: **Métodos para repeler artrópodos utilizando isolongifolenona**

30 Prioridad:

13.07.2007 US 777795
21.04.2008 US 106505

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.09.2013

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY OF
AGRICULTURE (100.0%)
1400 INDEPENDENCE AVENUE SW
WASHINGTON, DC 20250-0302, US**

72 Inventor/es:

**ZHANG, AIJUN;
CARROLL, JOHN F.;
WANG, SHIFA y
KLUN, JEROME A.**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 421 442 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

Métodos para repeler artrópodos utilizando isolongifolenona.

Sector de la técnica

5 La presente invención se refiere al uso de isolongifolenona para repeler artrópodos tratando un objeto o un área con una cantidad eficaz para repeler artrópodos de isolongifolenona.

Estado de la técnica

10 Las enfermedades transmitidas por artrópodos hematófagos son una amenaza grave para la salud pública a nivel mundial. Cada año se presentan más de 700 millones de casos de enfermedades transmitidas por mosquitos (Shell, E. R., Atlantic Monthly, págs. 45-60, agosto 1997). Más de tres mil millones de personas viven bajo la amenaza de la malaria, que mata a más de un millón de personas cada año (Informe de la OMS de la malaria en el mundo 2005, Roll Back Malaria, World Health Organization, UNICEF, <http://rbm.who.int/wmr2005>). En Estados Unidos, el virus del Nilo Occidental ha sido transmitido por mosquitos a más de 8.000 personas desde 1999-2005, produciendo más de 780 muertes (DeBiasi, R. L., y K. L. Tyler, Nat. Clin. Pract. Neurol., 2:264-275 (2006)). La *N,N*-dietiltoluamida (Deet) se considera el mejor repelente de insectos que se ha desarrollado y es el repelente de insectos más ampliamente
15 utilizado en el mundo con decenas de millones de dólares de ventas anuales (Osimitz, T. G., y R. H. Grothaus, J. Am. Mosq. Control. Assoc., 11: 274-278 (1995)). Sin embargo, Deet disuelve los plásticos y las pinturas, y la bibliografía clínica informa acerca de la asociación de Deet con neurotoxicidad en seres humanos (Robbins, P. J., y M. G. Chemiack, J. Toxicol. Environ. Health, 18: 503-525 (1986)). Por tanto, son necesarias alternativas eficaces al Deet.

20 El documento WO 00/19822 describe el uso de ingredientes de perfume seleccionados, entre los cuales está la isolongifolanona, como repelentes de insectos, normalmente mediante la aplicación a un sustrato o hacia un espacio aéreo.

25 Los inventores han descubierto que la (-)-isolongifolenona, que aparece en la naturaleza en cantidades traza, es más eficaz que Deet para repeler garrapatas y disuadir a mosquitos en busca de alimento. Con una alta eficacia repelente, este compuesto permite una aplicación mucho más amplia por parte de la ciudadanía y el ejército. Por tanto, la isolongifolenona tiene un gran potencial para desplazar a Deet en el mercado de los repelentes a nivel mundial.

Objeto de la invención

30 Según la presente invención, se proporciona un método para repeler artrópodos que implica tratar un objeto o un área con una cantidad eficaz para repeler artrópodos de isolongifolenona.

Descripción de las figuras La figura 1 muestra la preparación de isolongifolenona **1** a partir de isolongifoleno.

35 La figura 2 muestra la proporción media de hembras de *Aedes aegypti* y *Anopheles stephensi* que no pican (\pm ES) expuestas a isolongifolenona (25 nmol/cm² de tela) y Deet (25 nmol/cm² de tela) y a un blanco control (etanol al 95%) en un módulo K&D *in vitro* (sistema de bioensayo de módulo de Klun & Deboun; Klun, J. A., *et al.*, J. Amer. Mosquito Control Assoc., 21: 64-70 (2005)). Se ensayaron doscientas hembras de cada especie de mosquito frente a cada tratamiento. Las medias seguidas de diferentes letras son significativamente diferentes a $\alpha = 0,05$ [$n = 40$, $F(5,234) = 67,03$, $P < 0,0001$].

40 La figura 3 muestra la respuesta a la dosis de *A. aegypti* hembras que no pican en el bioensayo de K&D *in vitro* a cinco concentraciones de Deet e isolongifolenona (4, 9, 16, 25 y 36 nmol de compuesto/cm² de tela). Se ensayaron 200 mosquitos frente a cada dosis de compuesto. Las proporciones de mosquitos disuadidos por (-)-isolongifolenona fueron significativamente mayores que las proporciones de mosquitos disuadidos por Deet a unas dosis de 25 y 36 nmol de compuesto/cm² de tela, respectivamente ($n = 40$, $F(2,117) = 107,47$, $P < 0,0001$; $n = 40$, $F(2,117) = 329,38$, $P < 0,0001$).

45 La figura 4 muestra la respuesta a la dosis de ninfas de *Ixodes scapularis* en bioensayos de la punta del dedo (tira de tela tratada enrollada alrededor del dedo) frente a tres concentraciones de Deet e isolongifolenona (19,5, 39 y 78 nmol de compuesto/cm² de tela) y etanol (al 95%) como blanco control (concentración de compuesto igual a cero). El número total de ninfas de *I. scapularis* ensayadas para cada tratamiento fue 40.

La figura 5 muestra las estructuras de la (-)-isolongifolenona (J4-118) y algunos análogos de isolongifolenona, que no son parte de la presente invención.

50 La figura 6 muestra la proporción media de hembras de *A. aegypti* que no pican (\pm ES) cuando se exponen a análogos de (-)-isolongifolenona que no forman parte de la invención, a Deet a 25 nmol/cm² de tela, y a un control de

etanol al 95% en el bioensayo K&D *in vitro*. Las medias seguidas de diferentes letras son significativamente diferentes a $\alpha = 0,05$.

La figura 7 muestra la proporción media de ninfas de garrapata *Ix. scapularis* repelidas por (-)-isolongifolenona (J4-118) y análogos de isolongifolenona que no forman parte de la invención a 155 nmol/cm² de tela, y un control de etanol al 95% en el bioensayo de la punta del dedo. Las garrapatas que se trasladaron a la punta del dedo no tratada o que se cayeron del dedo a los 15 min después de que fueran liberadas sobre el dedo se consideraron repelidas. Las medias seguidas de diferentes letras son significativamente diferentes a $\alpha = 0,05$ [$n = 3$, $F(7,16) = 13,66$, $P < 0,0001$].

Descripción detallada de la invención

Los inventores han logrado con éxito convertir el isolongifoleno en isolongifolenona 1 (figura 1) utilizando hidroperóxido de *tert*-butilo como oxidante, y hexacarbonilo de cromo como catalizador (que puede reciclarse). Este método emplea un tiempo de reacción corto y produce un producto de alta pureza con alto rendimiento. Por ejemplo, la tasa de conversión es de aproximadamente 99% (por ejemplo, 99%) y se formó aproximadamente 90% (por ejemplo, 90%) de isolongifolenona después de aproximadamente 2 h (por ejemplo, 2 h) de oxidación; en aproximadamente 3,5 h (por ejemplo, 3,5 h), el isolongifoleno fue oxidado en aproximadamente 100% (por ejemplo, 100%), y se logró un rendimiento de aproximadamente 93% (por ejemplo, 93%) de isolongifolenona. La pureza química del producto bruto fue de aproximadamente 94% (por ejemplo, 94%). Después de una purificación mediante una cromatografía en columna de resolución rápida, la pureza química puede ser > aproximadamente 99% (por ejemplo, > 99%).

En general, la isolongifolenona se produce haciendo reaccionar una disolución que contiene (-)-isolongifoleno, hexacarbonilo de cromo e hidroperóxido de *t*-butilo; la disolución generalmente también contiene acetonitrilo y benceno. Generalmente, la disolución contiene aproximadamente 1 (por ejemplo, 1) molar de isolongifolenona, aproximadamente 0,3-aproximadamente 1 (por ejemplo, 0,3-1) equivalentes molares de hexacarbonilo de cromo, aproximadamente 2-aproximadamente 5 (por ejemplo, 2-5) equivalentes molares de hidroperóxido de *t*-butilo, y aproximadamente 80-aproximadamente 95% (por ejemplo, 80-95%) (en p/p) de acetonitrilo, y aproximadamente 8-aproximadamente 9,5% (por ejemplo, 8-9,5%) (en p/p) de benceno, basados en la isolongifolenona. La disolución se calienta (generalmente de aproximadamente 80 °C a aproximadamente 82 °C (por ejemplo, 80 °C-82 °C)) durante aproximadamente 2 a aproximadamente 4 horas (por ejemplo, 2-4 horas). La disolución después se enfría hasta la temperatura ambiente (por ejemplo, utilizando un baño de hielo), se filtra, y el precipitado (hexacarbonilo de cromo) se lava con benceno frío. El filtrado se diluye con hexano y se lava con agua, salmuera, y se seca sobre Na₂SO₄. El disolvente se evapora a presión reducida para producir un producto bruto (pureza de aproximadamente 94% (por ejemplo, 94%)). La isolongifolenona puede purificarse (por ejemplo, mediante una cromatografía de resolución rápida sobre gel de sílice 60 Å (Fisher, malla 230-400) utilizando hexano-acetato de etilo como eluyente) para proporcionar isolongifolenona 1 como un semisólido blanco a temperatura ambiente (pureza > aproximadamente 99% (por ejemplo, 99%)). El material de partida, el isolongifoleno, para la producción de isolongifolenona también está disponible en el mercado como materia prima en cantidades de kg a toneladas (Zizhu Pharmaceutical Co., 2008 (<http://www.buyersguidechem.de/AliefAus.php?pname=Isolongifolene&pnu=420802573875&ca ss=>)).

Para reciclar el catalizador, la fase líquida se extrae con una pipeta de vidrio del matraz de reacción en el que la reacción finaliza, y el precipitado se lava varias veces con benceno frío; y después puede utilizarse una cantidad 15% menor de isolongifoleno (la fase líquida puede disolver un poco de catalizador) y oxidante para la posterior oxidación.

La isolongifolenona tiene una importancia conocida en la industria porque sus derivados se emplean ampliamente en fragancias, perfumes, ambientadores en aerosol, cosméticos, detergentes, desodorantes, tejidos, fibras y productos de papel (patente del Reino Unido n.º 1.256.535; patente de EEUU n.º 3.647.847; patente del Reino Unido n.º 1505821; patente de EEUU n.º 3.718.698; patente de Alemania n.º 10.038.544 A1; patente de EEUU n.º 6.734.159; De Bruyn, M., *et al.*, *Angew. Chem. Internat. Edit.*, 42: 5333-5336 (2003)). Además, se ha descubierto que la isolongifolenona y otros derivados son activos contra la tirosinasa, que es una enzima que contiene cobre multifuncional para la biosíntesis de melanina en plantas y animales (Choudhary, M. I., *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 86:3450-3460 (2003)). En fechas recientes, se ha descubierto que los extractos brutos de los tallos y las hojas de *Humiria balsamifera* St. (Aubl.) Hill (Humiriáceas), con una distribución generalizada en el Amazonas y las regiones nororientales de Brasil, posee actividad antimalaria (Da Silva, T. B. C., *et al.*, *Pharm. Biol.*, 42: 94-97 (2004)). Varios compuestos, incluyendo la isolongifolenona, se han aislado e identificado como los productos naturales de estas especies vegetales.

Los inventores también han descubierto que la isolongifolenona puede utilizarse para repeler artrópodos. Así, la presente invención también se refiere a un método para repeler artrópodos que implica tratar un objeto o un área con una cantidad eficaz para repeler artrópodos de isolongifolenona.

Un repelente de artrópodos es cualquier compuesto o composición que disuade a los insectos para que no piquen y se alimenten de un hospedante. Así, el término "repelente" se define como lo que inhibe la alimentación de artrópodos cuando un producto químico está presente en un lugar en el que los insectos (por ejemplo, *Aedes aegypti*) se alimentarían en ausencia del producto químico, y también incluye lo que provoca que los artrópodos (por ejemplo, moscas y garrapatas) realicen movimientos orientados hacia el alejamiento de la fuente de un repelente químico (Dethier, V. L., et al., J. Econ. Ent., 53:134-136 (1960)). Así, el término "repelente" también incluye reducir el número de picaduras de artrópodos (por ejemplo, *Aedes aegypti*) sobre un área o un objeto tratados (por ejemplo, la piel de un mamífero que se ha tratado por vía tópica con las composiciones o los compuestos de la presente invención), cuando se compara con la misma área u objeto que no se han tratado, y el término "repelente" también incluye provocar que los artrópodos (por ejemplo, garrapatas) realicen movimientos orientados hacia el alejamiento de un área o un objeto tratados (por ejemplo, la piel de un mamífero que se ha tratado por vía tópica con las composiciones o los compuestos de la presente invención), cuando se compara con la misma área u objeto que no se han tratado.

El método para repeler artrópodos de un objeto (por ejemplo, mamíferos, tales como seres humanos) o un área (por ejemplo, una superficie, tal como la piel humana) implica tratar (o exponer) el objeto o el área con isolongifolenona. Los términos "objeto" o "área", tal como se emplean en la presente, incluyen cualquier lugar en el que la presencia de animales nocivos diana no resulte deseable, incluyendo cualquier tipo de instalaciones, que pueden ser al aire libre, tales como jardines, céspedes, tiendas de campaña, mosquiteras para acampada, áreas de acampada, etc., o interiores, tales como graneros, garajes, edificios comerciales, hogares, etc., o cualquier área en la que los animales nocivos son un problema, tales como en recipientes de transporte o almacenaje (por ejemplo, bolsas, cajas, cajones de embalaje, etc.), materiales de envasado, lechos, etc.; también incluye la cubierta externa de un ser humano, tal como la piel, el pelo, el cabello, o la ropa.

Por tanto, la isolongifolenona puede utilizarse para repeler artrópodos perjudiciales o molestos, tales como insectos, garrapatas y ácaros que pican y se alimentan/chupan sangre.

Los artrópodos incluyen mosquitos (por ejemplo, especies de *Aedes*, *Culex* y *Anopheles*), mosquitos simúlidos (por ejemplo, especies de *Phlebotomus* y *Lutzomyia*), chinches de la cama (por ejemplo, *Cimex lectularius*), jejenes de moscas de arena (*Phlebotomus*), dípteros nematóceros (especies de *Culicoides*), moscas negras (especies de *Simulium*), moscas mordedoras (por ejemplo, *Stomoxys calcitrans*), moscas tsetsé (especies de *Glossina*), tábanos (especies de *Tabanus*, *Haematopota* y *Chrysops*), moscas domésticas (por ejemplo, *Musca domestica* y *Fannia canicularis*), moscas de la carne (por ejemplo, *Sarcophaga carnaria*), moscas que provocan miasis (por ejemplo, *Lucilia cuprina*, *Chrysomya chloropyga*, *Hypoderma bovis*, *Hypoderma lineatum*, *Dermatobia hominis*, *Oestrus ovis*, *Gasterophilus intestinalis* y *Cochliomyia hominivorax*), chinches (por ejemplo, *Cimex lectularius*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*), piojos (por ejemplo, *Pediculus humanus*, *Haematopinus suis* y *Damalina ovis*), moscas piojo (por ejemplo, *Melaphagus orinus*), y pulgas (por ejemplo, *Pulex irritans*, *Cthenocephalides canis* y *Xenopsylla cheopis*) y pulgas de arena (por ejemplo, *Dermatophilus penetrans*).

Los insectos perjudiciales o molestos incluyen cucarachas (por ejemplo, *Blattella germanica*, *Periplaneta americana*, *Blatta orientalis* y *Supella supellectilium*), escarabajos (por ejemplo, *Sitophilus granarius*, *Tenebrio molitor*, *Dermesies lardarius*, *Stegobium paniceum*, *Anobium punctatum* y *Hylotrupes bajulus*), termitas (por ejemplo, *Reticulitermes lucifugus*) y hormigas (por ejemplo, *Lasius niger*).

Las garrapatas hematófagas incluyen, por ejemplo, *Ornithodoros moubata*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes scapularis*, *Boophilus microplus*, *Amblyomma americanum*, y *Amblyomma hebreum*, y los ácaros incluyen, por ejemplo, *Sarcoptes scabiei* y *Dermanyssus gallinae*.

El compuesto según la invención, que puede utilizarse en forma no diluida o diluida, puede convertirse en formulaciones habituales para repelentes. Puede utilizarse en todas las formas de presentación habituales en cosméticos, por ejemplo, en forma de disoluciones, emulsiones, geles, ungüentos, pastas, cremas, polvos, barras, pulverizados o aerosoles emitidos desde latas de pulverización.

Para su uso en un sector que no sea el cosmético, los compuestos pueden incorporarse, por ejemplo, en gránulos, agentes de pulverización oleosos o formulaciones de liberación lenta.

Para la protección frente a los artrópodos, tales como insectos, garrapatas o ácaros hematófagos, el compuesto según la invención generalmente se aplica a la piel humana o animal, o se tratan prendas de vestir y otros objetos con el compuesto.

El compuesto según la invención también es adecuado como aditivo para agentes impregnantes, por ejemplo, para mallas textiles, artículos de vestir y materiales de envasado, y como aditivo para agentes de abrillantamiento, limpieza y limpiaventanas.

- La cantidad del compuesto utilizado será al menos una cantidad eficaz. La expresión "cantidad eficaz", tal como se emplea en la presente, significa la cantidad mínima del compuesto necesaria para reducir el número de picaduras de artrópodos (por ejemplo, *Aedes aegypti*) sobre un área o un objeto tratados (por ejemplo, la piel de un mamífero que se ha tratado por vía tópica con el compuesto de la presente invención), cuando se compara con la misma área u objeto que no se han tratado. La expresión "cantidad eficaz", tal como se emplea en la presente, también significa la cantidad mínima del compuesto necesaria para provocar que los artrópodos realicen movimientos orientados hacia el alejamiento de un área o un objeto tratados (por ejemplo, la piel de un mamífero que se ha tratado por vía tópica con el compuesto de la presente invención), cuando se compara con la misma área u objeto que no se han tratado. Por ejemplo, generalmente se emplean aproximadamente 10-300 (por ejemplo, 10-300) nmol de isolongifolenona por cm² de tela o piel, preferiblemente de aproximadamente 10-200 (por ejemplo, 10-200) nmol/cm² de tela o piel, más preferiblemente de aproximadamente 20-100 (por ejemplo, 20-100) nmol/cm² de tela o piel, y lo más preferiblemente de aproximadamente 20-80 (por ejemplo, 20-80) nmol/cm² de tela o piel. Las concentraciones eficaces del compuesto en las composiciones generalmente pueden variar entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 95% (por ejemplo, 0,1-95%) en peso, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 90% (por ejemplo, 0,5-90%). Por supuesto, la cantidad precisa necesaria variará según la composición repelente concreta utilizada, el tipo de área u objeto que se va a tratar, el número de horas o días de acción repelente necesarios, y el entorno en el que está localizado el área o el objeto. La cantidad precisa de repelente puede ser determinada con facilidad por los expertos en la técnica a la vista de las indicaciones de esta solicitud. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden seguir el procedimiento empleado a continuación.
- El compuesto puede utilizarse con otros repelentes o agentes para el control de artrópodos (por ejemplo, insecticidas, quimioesterilizantes o similares). Cuando se utilicen, estos agentes deberían emplearse en una cantidad que, según pueden determinar con facilidad los expertos en la técnica, no interfiera con la eficacia del compuesto.

- A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece la invención. Aunque puede utilizarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente para la práctica o el ensayo de la presente invención, a continuación se describirán los métodos y los materiales preferidos.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar más a fondo la invención, según se define mediante las reivindicaciones.

Ejemplos

- Bioensayo del mosquito: Los mosquitos de la fiebre amarilla, *Aedes aegypti* (cepa de ojos rojos de Liverpool) y los mosquitos vectores de la malaria, *Anopheles stephensi*, empleados en este estudio se obtuvieron de colonias mantenidas en the Walter Reed Army Institute of Research, Department of Entomology, Silver Spring, MD. Los mosquitos se criaron utilizando el procedimiento de Gerberg *et al.* (Gerberg, E. J., *et al.*, Manual for mosquito rearing and experimental techniques, 1994, AMCA Inc., Lake Charles, LA). Las larvas fueron alimentadas con copos triturados para peces tropicales (Tetramin Tropical Fish Flakes, Tetra Sales, Blacksburg, VA, www.tetra-fish.com). Las colonias se mantuvieron en un fotoperíodo de 12:12 h (L:O, encendiendo las luces a las 06:00 h) a 27 °C y 80% de HR. Los mosquitos adultos fueron suministrados con tampones de algodón humedecidos con una disolución de sacarosa acuosa al 10%.

- La actividad disuasoria de la picadura de mosquitos comparativa de la isolongifolenona y Deet se evaluó utilizando los mosquitos *A. aegypti* y *An. stephensi*. La isolongifolenona se sintetizó según se describió anteriormente. El repelente químico sintético conocido y ampliamente utilizado Deet (McCabe, E. T., *et al.*, J. Org. Chem., 19:493-498 (1954)) se obtuvo en Morflex, Inc., Greensboro, N.C. El Deet a menudo se considera como el mejor repelente de mosquitos que se ha desarrollado (Elston, D. M., J. Am. Acad. Dermatol., 36:644-645 (1998)), y se emplea como patrón oro con el cual se comparan los nuevos repelentes candidatos. Se realizó un bioensayo comparativo de los dos compuestos utilizando el sistema de bioensayo del módulo K&D *in vitro* (Klun *et al.*, 2005). El sistema de ensayo K&D *in vitro* consiste en tres componentes: (1) un módulo K&D de Plexiglas™ de 29,7 cm x 7,1 cm compuesto por seis células adyacentes, cada una diseñada para contener mosquitos y cada una con un orificio rectangular en el suelo de 3 x 4 cm que se abre y se cierra con una puerta corredera; (2) un depósito calentado (38 °C) de un baño de agua de Plexiglas™ de 29,7 cm x 7,1 cm de seis pocillos, con seis pocillos de 3 x 4 cm, diseñado para que se corresponda con los orificios de puertas correderas de la base del módulo K&D y para que contenga 6 mL de eritrocitos humanos calentados. Los pocillos se cubren con una membrana de colágeno (la unidad de membrana-células sanguíneas simula un hospedante humano para que los mosquitos se alimenten); (3) un separador de Teflon® de 29,7 x 7,1 cm x 0,4 cm que tiene seis orificios rectangulares similares al módulo K&D. En el estudio, se aplicaron los compuestos de ensayo en una disolución de etanol al 95% a áreas de un tela de 3 x 4 cm marcadas con un rotulador sobre una tira de 29,7 cm x 7,1 cm de tela de organdí. Los inventores aplicaron rutinariamente las disoluciones de etanol (115 µL) a 0,5 cm fuera de las áreas de la tela marcadas de 3 x 4 cm para asegurarse de que los mosquitos nunca fueran expuestos a áreas de la tela sin tratar. Las áreas tratadas (25 nmol/cm² de tela) se hicieron corresponder y cubrieron los pocillos de células sanguíneas cubiertos con la membrana de colágeno del

depósito de células sanguíneas; se empleó la dosis de 25 nmol de compuesto/cm² porque unos bioensayos previos de dosis-respuesta con Deet y otros compuestos repelentes convencionales demostraron que esta dosis, aplicada a la piel humana o a una tela, provocó una supresión de aproximadamente 80% de las picaduras de mosquito, comparado con controles (Klun *et al.*, 2005; Klun, J. A., *et al.*, J. Med. Entomology, 40: 293-299 (2003)). El separador de Teflon® se colocó sobre la tela tratada. La función del separador es evitar el contacto directo del módulo con la tela químicamente tratada. Un replicado del bioensayo consiste en tres tratamientos: isolongifolenona, Deet, y tela tratada con etanol al 95% como control. Los inventores utilizaron dos replicados con los tratamientos colocados aleatoriamente sobre las seis células de un depósito.

Los bioensayos con mosquitos se realizaron con sistemas de módulos K&D *in vitro* colocados en una campana de gases química sin conexión Purair (Air Science USA, LLC, Fort Myers, FL) de 1300-1600 h a lo largo de los días a 24 °C-26 °C y 24-51% de HR en luz ambiental de laboratorio. Se ensayaron *A. aegypti* y *A. stephensi* (5-15 días) cruzadas nulíparas, y no accedieron al agua durante las 24 h anteriores al ensayo. Los mosquitos se cargaron en cada una de las seis células del módulo K&D adyacentes e inmediatamente después de ser cargados se expusieron a 2 replicados de los tres tratamientos sobre la tela de organdí. De forma rutinaria, un módulo K&D de seis células que contiene cinco mosquitos/célula se coloca sobre el separador de Teflon® sobre la tela de los tratamientos secada al aire que cubren los pocillos de sangre-membrana, y la trampilla de las puertas de los módulos K&D se abrieron para exponer los tratamientos a los conjuntos de mosquitos. Después de una exposición de 3 minutos, se registró el número de mosquitos que pican a través de las telas de los tratamientos en cada célula, y los mosquitos se volvieron a introducir en las células.

En un ensayo de dosis-respuesta, se ensayó *A. aegypti* frente a Deet y (-)-isolongifolenona a 0, 4, 9, 16, 25 y 36 nmol de compuesto/cm² de tela. Se ensayaron doscientos mosquitos frente a cada dosis de cada compuesto. Como procedimiento de control de calidad de mosquitos en los ensayos de dosis fija y de dosis-respuesta, los inventores analizaron arbitrariamente sólo los conjuntos de datos en los que tres o más hembras pican (una proporción de 0,4 o menor que no pican) en la célula control. Esta estrategia ayuda a asegurarse de que los productos químicos se evalúan utilizando los datos obtenidos con mosquitos que pican de manera agresiva.

En los ensayos por replicado, cada uno de los tratamientos químicos se ensayó frente a 200 hembras de *A. aegypti* y 200 hembras de *A. stephensi* (40 replicados). Los análogos de isolongifolenona se bioensayaron comparativamente frente a Deet y un control utilizando los mismos procedimientos que antes, pero empleando *A. aegypti* con 100 mosquitos expuestos a cada compuesto (20 replicados). Los datos de no picaduras se convirtieron en proporciones, y después se transformaron mediante la transformación estabilizante de la varianza convencional para las proporciones ($\arcsin \sqrt{p}$, en el que p es la proporción original) para ajustarse a la suposición de la homogeneidad de las varianzas para el análisis de la varianza (ANOVA). Las medias de las no picaduras se compararon mediante un ANOVA unidireccional, seguido de un ensayo de rangos de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (SPSS 10.0 para Windows para una significancia al nivel $\alpha = 0,05$, George, D., y P. Mallery, SPSS for Windows step by step: A simple guide and reference, 4.^a ed., 2002, Allyn & Bacon, Boston, MA).

Bioensayo de garrapatas: Se criaron ninfas de garrapatas de patas negras (*Ixodes scapularis*) a partir de larvas obtenidas de la colonia del laboratorio de Oklahoma State University, Stillwater, OK, y se alimentaron de ratas (Beltsville Area Animal Care and Use Committee Protocol n.º 05-0122) en the U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, MD. Se obtuvieron ninfas de la garrapata solitaria (*Amblyomma americanum*) de una colonia del USDA, ARS, Knipling-Bushland U.S. Livestock Insects Research Laboratory, Kerrville, TX. Ambas especies de garrapata se mantuvieron a 24 °C., aproximadamente 97% de HR y 16:8 h luz-oscuridad hasta el ensayo.

El bioensayo de la punta del dedo utilizado por Schreck *et al.* (Schreck, C. E., *et al.*, J. Am. Mosq. Control Assoc., 11:136-140 (1995)) fue modificado (Carroll, J. F., *et al.*, Exp. Appl. Acarol., 41:215-224 (2007); Carroll, J. F., *et al.*, Med. Vet. Entomol., 19:101-106 (2005)) aplicando tratamientos a la capa externa de una tira de tela (organdí) que después se enrolló dos veces alrededor de la falange media de un dedo índice. Se cortó una tira de 7 x 7 malla/mm de tela de organdí (G Street Fabrics, Rockville, MD) con forma de un palo de hockey (sección larga 9 cm, sección corta 4,5 cm, anchura 4-4,5 cm) de manera que cuando la tela se enrolla dos veces alrededor de la falange media del dedo índice, cubre completamente el área entre las arrugas más profundas de las articulaciones distal y media del dedo de un sujeto voluntario. La tela se extiende 5-6 mm proximalmente más allá de la arruga más profunda de la articulación media y se solapa en 1-3 mm. Tras colocar la tira de tela, los límites del área que va a recibir el tratamiento con repelente (entre las arrugas más profundas de las articulaciones distal y media) se marcan sobre la tela con un lápiz de grafito. Esta tela se utiliza como molde para determinar los límites en otras telas.

Se prepararon disoluciones madre de etanol al 95% estequiométricamente equivalentes de los compuestos: 50 nmol de Deet/μL y 50 nmol de isolongifolenona o análogo de isolongifolenona/μl para su uso en todos los bioensayos. Los volúmenes de las respectivas disoluciones utilizadas para generar dosis de 155 nmol de repelente/cm² de tela se basaron en las dimensiones de la falange media del dedo índice izquierdo de un sujeto voluntario. El volumen de las disoluciones tratadas requiere administrar los nmol/cm² de tela deseados. Las dosificaciones se calcularon a partir

de la media de las circunferencias de las dos articulaciones del dedo, multiplicada por la distancia entre la arruga más profunda de cada articulación.

Se aplicó una disolución de repelente (52 μ l) o etanol (control) del mismo volumen al área de tratamiento designada sobre la tela y se dejó secar. Al igual que en Schreck *et al.* (1995), fue necesario seleccionar las ninfas de *I. scapularis* para detectar los individuos activos. Mientras la tela tratada se secaba, las ninfas de *I. scapularis* fueron trasladadas con un fórceps desde el vial de contención hasta un dedo. Se aislaron 10 garrapatas que se movieron \geq 5 mm en una placa Petri que se había pegado dentro de una placa Petri más grande con agua añadida en el espacio entre sus lados para formar un foso. Después de que la tela se secase (10-12 mm), se enrolló dos veces alrededor del dedo índice. Para mantener la tela enrollada alrededor del dedo, se aplicaron tres gotitas de cera de abeja sobre la superficie superior de la capa interna de la tela en el borde del solapamiento y se aplicó presión durante 10 s. Utilizando un fórceps, las 10 garrapatas seleccionadas se colocaron sobre la punta del dedo extendido en horizontal entre la uña y el borde de la tela. Cuando la décima garrapata fue colocada sobre el dedo, el dedo lentamente se puso en vertical con la punta hacia abajo. Se registraron los emplazamientos de las garrapatas a 1, 3, 5, 10 y 15 min después de su liberación sobre el dedo. *A. americanum*, que busca hospedante, es mucho más activa que *I. scapularis*, y así se dejó que 10 ninfas de *A. americanum* salieran directamente de un vial abierto hacia la punta del dedo. Para ambas especies, el dedo se mantuvo sobre placas Petri con foso mientras \geq 1 garrapata estuviera sobre él. Durante los bioensayos, las temperaturas varían de 23-26 °C y 10-56% de HR. Los datos de los repelentes se compararon mediante un ensayo de la t de muestras apareadas (SPSS 10.0 para Windows para una significancia al nivel $\alpha = 0,05$, George, D., y P. Mallery, SPSS for Windows step by step: A simple guide and reference, 4ª ed., 2002, Allyn & Bacon, Boston, MA).

Se ensayó una dosis (155 nmol de compuesto/cm² de tela) de repelente y etanol frente a cuatro grupos de 10 ninfas de *A. americanum* y cuatro grupos de ninfas de *I. scapularis*. Para el ensayo de dosis-respuesta, se ensayaron tres dosis (19,5, 39 y 78 nmol de compuestos/cm² de tela) de cada uno de Deet, isolongifolenona y control de etanol (al 95%) frente a cuatro grupos de 10 ninfas de *I. scapularis*. Se consideró que las garrapatas fueron repelidas si se cayeron del dedo o se trasladaron a la punta no tratada 10 min después de que fueran colocadas sobre el dedo.

Resultados y análisis: La figura 2 muestra la repelencia de dosis de 25 nmol/cm² de tela de isolongifolenona, Deet, y el control en bioensayos con los mosquitos *A. aegypti* y *A. stephensi*. Las proporciones de mosquitos que no picaron fueron significativamente mayores para la isolongifolenona y Deet que para el control y, de forma sorprendente, la isolongifolenona disuadió la picadura de *A. aegypti* y *A. stephensi* con más eficacia que Deet. La actividad disuasoria de la picadura de la (-)-isolongifolenona y Deet en *A. aegypti* aumentó a concentraciones crecientes. El análisis de regresión de los datos para la proporción de no picadura demostró que la relación de dosis-respuesta era lineal (figura 3). De forma sorprendente, las proporciones de mosquitos disuadidos por (-)-isolongifolenona fueron significativamente mayores que las proporciones disuadidas por Deet a una dosis de 25 y 36 nmol de compuesto/cm² de tela, respectivamente. La figura 6 muestra la repelencia de dosis de 25 nmol/cm² de tela de análogos de isolongifolenona, Deet, y el control en bioensayos con mosquitos *A. aegypti*. Las proporciones de mosquitos que no picaron fueron significativamente mayores para los análogos de isolongifolenona y Deet que para el control (de forma sorprendente, los análogos de isolongifolenona fueron en general tan eficaces como Deet), pero los análogos de isolongifolenona no disuadieron la picadura de *A. aegypti* con más eficacia que Deet, lo cual es contrario a lo sucedido con la isolongifolenona (figura 2).

La tabla 2 muestra los resultados de los bioensayos con garrapatas utilizando una dosis de 155 nmol/cm² de tela de isolongifolenona y comparada con el control contra *I. scapularis* y *A. americanum*. De forma sorprendente, la proporción de garrapatas repelidas por la isolongifolenona fue significativamente mayor que para el control. Por tanto, la isolongifolenona es un nuevo compuesto de partida que representa una alternativa a los compuestos sintéticos tradicionales que se han desarrollado y utilizado para la protección frente a artrópodos hematófagos que son vectores de enfermedades humanas.

Los datos experimentales de los inventores indican que el aumento en la proporción de ninfas de *I. scapularis* repelidas por isolongifolenona y Deet a lo largo de concentraciones crecientes (19,5, 39 y 78 nmol de compuestos/cm² de tela) seguía una cinética de primer orden. Las curvas de dosis-respuesta se describen mejor mediante las ecuaciones: $Y = 0,012x - 0,0354$, $r^2 = 0,9741$ para la isolongifolenona, e $Y = 0,0128x - 0,014$, $r^2 = 0,9781$ para Deet, respectivamente. De forma sorprendente, a 78 nmol/cm² de tela, ambos isolongifolenona y Deet repelieron 100% de las ninfas de *I. scapularis* (figura 4). Sin embargo, a 39 nmol/cm² de tela, la isolongifolenona y Deet repelieron 65% y 55% de las ninfas de *I. scapularis*, respectivamente, y a 19,5 nmol/cm² de tela, la isolongifolenona y Deet repelieron 35% y 15%, respectivamente.

La figura 7 muestra los resultados de los bioensayos con garrapatas utilizando dosis de 155 nmol/cm² de tela de análogos de isolongifolenona que no forman parte de la invención, comparados con la isolongifolenona y el control contra *I. scapularis*. De modo sorprendente, la proporción de garrapatas repelidas por todos los análogos de isolongifolenona fue significativamente mayor que para el control, y algunos análogos de isolongifolenona fueron tan eficaces como la isolongifolenona.

Así, los datos de los inventores demuestran los efectos repelentes de la isolongifolenona y de análogos de isolongifolenona contra artrópodos hematófagos. Los bioensayos demuestran que la isolongifolenona disuade la picadura de dos especies de mosquitos, *A. aegypti* y *A. stephensi*, con más eficacia que Deet, un repelente de referencia utilizado a nivel mundial, y que la mayoría de los análogos de isolongifolenona disuaden la picadura de *A. aegypti* con tanta eficacia como Deet. También descubrieron que la isolongifolenona y algunos análogos de isolongifolenona repelieron la garrapata *I. scapularis* con tanta eficacia como Deet. Sin embargo, a una concentración menor, la isolongifolenona mostró mayor eficacia contra *I. scapularis* comparado con Deet.

Todas las referencias citadas en la presente, incluyendo las patentes de EEUU, se incorporan como referencia en su totalidad. También se incorporan como referencia en su totalidad las siguientes referencias: Muthyala, R. S., *et al.*, J. Med. Chem., 46:1589-1602 (2003); Novak, R. J., y E. J. Gerberg, J. Am. Mosquito Control Assoc. (Suplemento), 21:7-11 (2005); Shiino, M., *et al.*, Bioorg. Med. Chem., 9:1233-1240 (2001).

Así, a la vista de lo anterior, la presente invención se refiere (en parte) lo siguiente:

Un método para repeler artrópodos, que comprende (o que comprende fundamentalmente) tratar un objeto o un área con una cantidad eficaz para repeler artrópodos de isolongifolenona.

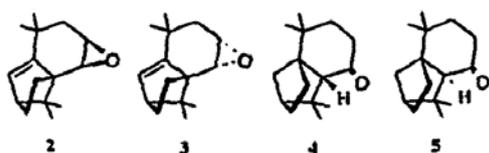
El anterior método, en el que dicha cantidad eficaz para repeler artrópodos de isolongifolenona es aproximadamente 10-aproximadamente 300 nmol/cm² o es aproximadamente 10-aproximadamente 200 nmol/cm² o es aproximadamente 20-aproximadamente 100 nmol/cm² o es aproximadamente 20-aproximadamente 80 nmol/cm². El anterior método, en el que dichos artrópodos se seleccionan del grupo que consiste en especies de *Aedes*, especies de *Culex*, especies de *Anopheles*, especies de *Ornithodoros*, especies de *Ixodes*, especies de *Boophilus*, especies de *Amblyomma*, y sus mezclas. El anterior método, en el que dichos artrópodos se seleccionan del grupo que consiste en *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, *Ixodes scapularis*, *Amblyomma americanum*, y sus mezclas. El anterior método, en el que dichos artrópodos se seleccionan del grupo que consiste en *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, y sus mezclas. En el anterior método, dichos artrópodos se seleccionan del grupo que consiste en *Ixodes scapularis*, *Amblyomma americanum*, y sus mezclas.

Tabla 1. Oxidación de isolongifolenona bajo diferentes condiciones^a

Entrada	Oxidantes	Catalizador	Tiempo (h)	Conversión (%)	Proporciones de producto (%) ^{b,c}					
					(2)	(3)	(4)	(5)	(1)	Otros ^d
1	H ₂ O ₂	Cr(CO) ₆	1,0	18,7	23,5	11,5	164	77	35,3	5,6
2	H ₂ O ₂	Cr(CO) ₆	2,5	19,1	229	111	162	76	36,4	58
3	H ₂ O ₂	Cr(CO) ₆	180	46,6	144	62	234	74	37,7	109
4	CH ₃ COOOH	-	18	99,8	0	0	839	3,1	0,8	122
5	CH ₃ COOOH	Cr(CO) ₆	15	100	0	0	802	46	0,5	147
6	(CH ₃) ₃ COOH	-	10	17,9	25	24	73	78	75,4	46
7	(CH ₃) ₃ COOH	-	40	37,5	17	1,3	64	61	79,8	47
8	(CH ₃) ₃ COOH	-	16,0	70,8	09	08	29	40	84,7	67
9	(CH ₃) ₃ COOH	-	210	84,8	07	06	32	40	84,7	68

10	(CH ₃) ₃ COOH	-	235	95,1	01	01	24	30	77,1	173
11	(CH ₃) ₃ COOH	Cr(CO) ₆	0,5	35,2	11	09	11	51	66,2	256
12	(CH ₃) ₃ COOH	Cr(CO) ₆	10	88,7	15	07	11	27	85,0	90
13	(CH ₃) ₃ COOH	Cr(CO) ₆	1,5	97,0	13	06	10	24	88,6	61
14	(CH ₃) ₃ COOH	Cr(CO) ₆	20	98,9	13	0,6	12	21	90,7	41
15	(CH ₃) ₃ COOH	Cr(CO) ₆	2,5	99,5	14	07	22	12	91,5	30
16	(CH ₃) ₃ COOH	Cr(CO) ₆	30	99,6	15	08	15	19	91,7	26
17	(CH ₃) ₃ COOH	Cr(CO) ₆	35	100	1,4	08	21	11	93,0	12
18	(CH ₃) ₃ COOH	Cr(CO) ₆	4,0	100	1,5	10	23	-	93,2	20
19	C ₆ H ₅ C(CH ₃) ₂ OOH	-	2,0	59,2	-	-	105	59	76,6	69
20	C ₆ H ₅ C(CH ₃) ₂ OOH	-	45	73,4	10	11	78	63	76,6	72
21	C ₆ H ₅ C(CH ₃) ₂ OOH	-	700	76,6	13	13	47	66	81,5	46
22	C ₆ H ₅ C(CH ₃) ₂ OOH	Cr(CO) ₆	10	65,3	-	-	20	49	88,9	42
23	C ₆ H ₅ C(CH ₃) ₂ OOH	Cr(CO) ₆	4,0	80,6	11	08	14	44	88,0	43
24	C ₆ H ₅ C(CH ₃) ₂ OOH	Cr(CO) ₆	210	86,3	13	1,0	06	56	88,3	32
25	C ₆ H ₅ C(CH ₃) ₂ OOH	Cr(CO) ₆	45,0	86,7	12	10	10	54	88,5	29

a) Todos los productos químicos se utilizaron en la misma proporción. b) Determinado mediante GC y GC-MS.
d) Consiste en varios componentes no identificados.



c)

ES 2 421 442 T3

Tabla 2. Proporción de ninfas de garrapata repelidas por isolongifolenona en los bioensayos de la puntas del dedo (155 nmol/cm² de tela). Las garrapatas que se trasladaron a la punta del dedo no tratada o que se cayeron del dedo a los 10 min después de que fueran liberadas sobre el dedo se consideran repelidas*.

Especies	Tratamiento	Proporción repelida	t	P
<i>I. scapularis</i>	Control	0,06	-28,0	<0,001
	Isolongifolenona	1,0		
<i>A. americanum</i>	Control	0	-7,03	0,006
	Isolongifolenona	0,725		

* Se ensayaron tres grupos de 10 ninfas de garrapata *I. scapularis* y cuatro grupos de *A. americanum* con isolongifolenona y control.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para repeler artrópodos, comprendiendo dicho método tratar un objeto o un área con una cantidad eficaz para repeler artrópodos de isolongifolenona.
- 5 2.- El método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha cantidad eficaz para repeler artrópodos es 10-300 nmol/cm².
- 3.- El método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha cantidad eficaz para repeler artrópodos es 10-200 nmol/cm².
- 4.- El método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha cantidad eficaz para repeler artrópodos es 20-100 nmol/cm².
- 10 5.- El método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha cantidad eficaz para repeler artrópodos es 20-80 nmol/cm².
- 6.- El método según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos artrópodos se seleccionan del grupo que consiste en especies de *Aedes*, especies de *Culex*, especies de *Anopheles*, especies de *Ornithodoros*, especies de *Ixodes*, especies de *Boophilus*, especies de *Amblyomma*, y sus mezclas.
- 15 7.- El método según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos artrópodos se seleccionan del grupo que consiste en *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, *Ixodes scapularis*, *Amblyomma americanum*, y sus mezclas.
- 8.- El método según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos artrópodos se seleccionan del grupo que consiste en *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, y sus mezclas.
- 20 9.- El método según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos artrópodos se seleccionan del grupo que consiste en *Ixodes scapularis*, *Amblyomma americanum*, y sus mezclas.
- 10.- El método según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos artrópodos son *Aedes aegypti*.
- 11.- El método según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos artrópodos son *Anopheles stephensi*.
- 12.- El método según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos artrópodos son *Ixodes scapularis*.
- 13.- El método según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos artrópodos son *Amblyomma americanum*.

25

Figura 2

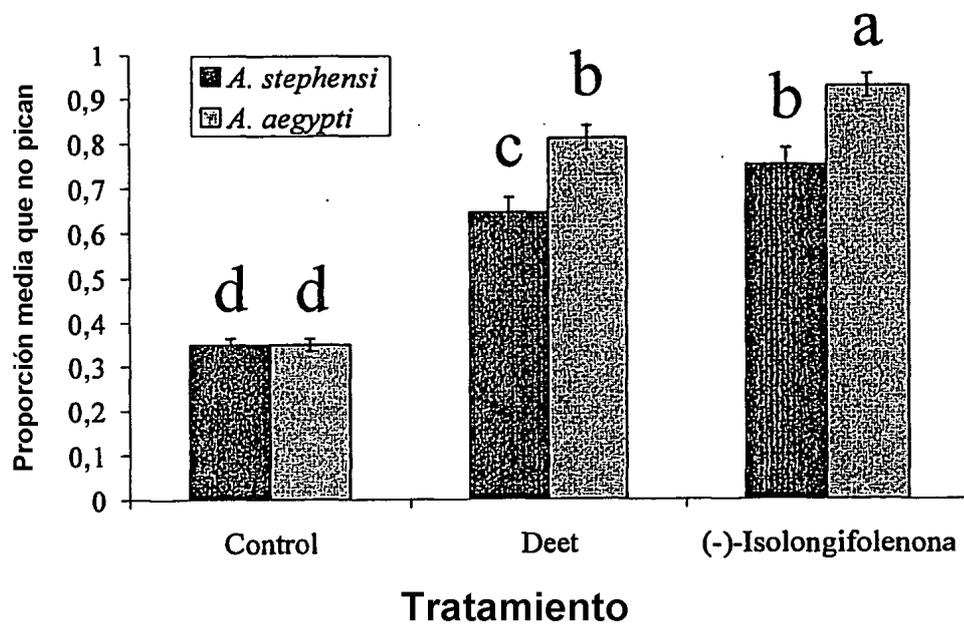


Figura 3

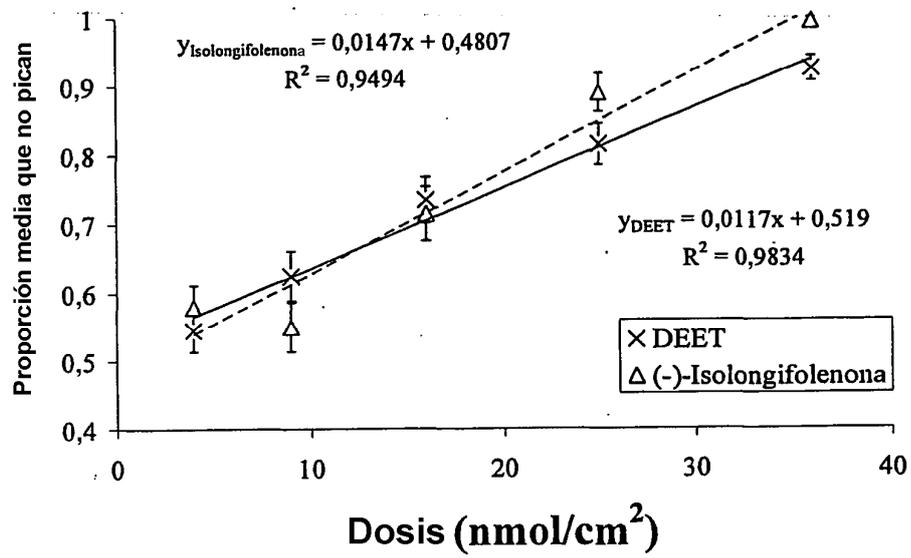


Figura 4

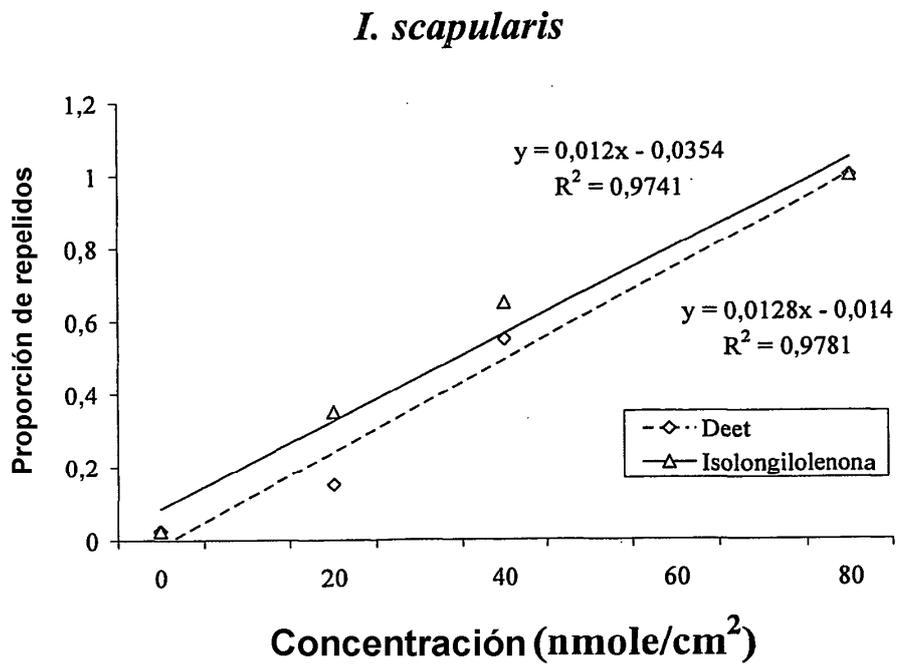
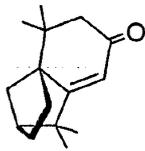
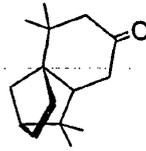


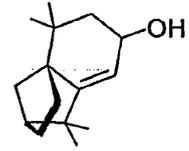
Figura 5



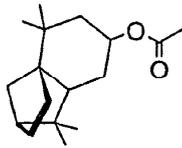
J4-118
(-)-Isolongifolenona



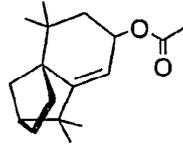
J4-120A



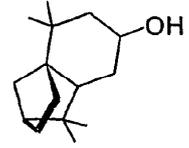
J4-120B



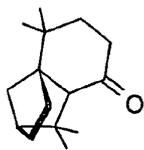
J4-120C



J4-120D



J4-120E



J4-120F
(-)-Isolongifolanona

Figura 6 (figura de referencia)

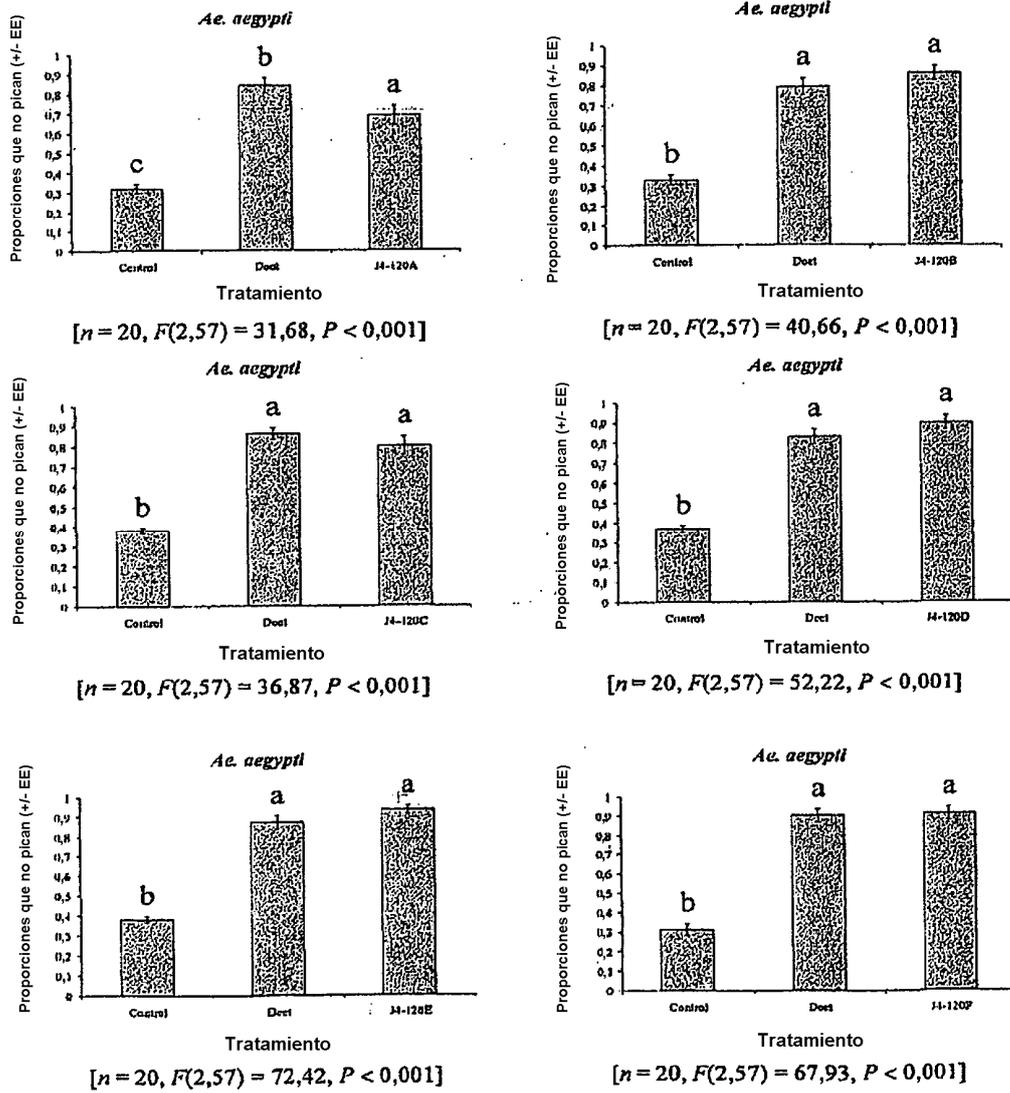


Figura 7

