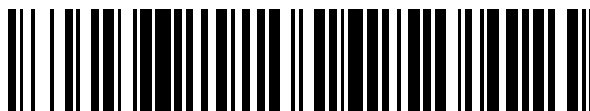


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 474**

51 Int. Cl.:

A61K 36/48 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2009 E 09746003 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2285391**

54 Título: **Extracto de fenogreco para el tratamiento de patologías humanas y animales que implican parásitos flagelados**

30 Prioridad:

13.05.2008 FR 0853068

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

01.04.2014

73 Titular/es:

**SETUBIO SAS (100.0%)
Bioparc Vichy-Hauterive
03270 Hauterive, FR**

72 Inventor/es:

**SERGERE, JEAN-CHRISTOPHE y
VIVARES, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 452 474 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

Extracto de fenogreco para el tratamiento de patologías humanas y animales que implican parásitos flagelados

5 La invención tiene por objetivo un extracto de fenogreco utilizado solo o incorporado en el seno de un complemento alimentario o de una composición farmacéutica para el tratamiento de las patologías humanas o animales en las que están implicados parásitos flagelados.

10 La invención queda más particularmente representada en relación con los parásitos flagelados, tales como *Histomonas meleagridis* y *Trichomonas vaginalis* si bien se puede aplicar a todos los parásitos flagelados que tienen estructura y fisiología similares a la de los parásitos citados que pertenecen al Phylum de las Metamonada.

15 El parásito *Histomonas meleagridis* es responsable de una enfermedad parasitaria infecciosa propia de las aves galliformes llamada histomonosis. Esta enfermedad es una tiplo-hepatitis que infecta particularmente al pavo. Se manifiesta por una diarrea de color amarillo azufre que comporta frecuentemente una importante mortalidad. La observación de cianosis de los apéndices carnosos de la cabeza hace que esta enfermedad lleve el nombre de enfermedad de cabeza negra ("black head disease"). Las otras señales clínicas son plumas manchadas de excrementos, anorexia, somnolencia, marcha anormal, cabeza baja o escondida bajo un ala. Se observa una mortalidad importante a partir del catorceavo día. En ausencia de tratamiento, pueden morir más del 90% de los animales. Las gallináceas, en particular los pavos que sobreviven, presentan retraso de desarrollo con respecto a los pavos que no han sido afectados clínicamente.

25 Ya se han propuesto numerosos tratamientos para luchar contra la histomonosis. En particular, los micro-imidazoles, tales como especialmente el dimetridazol (DMZ) son muy activos contra *Histomonas meleagridis*. No obstante, dada su toxicidad para los consumidores, esta familia de moléculas ha sido retirada del mercado. Se ha demostrado que el albendazol y los otros benzimidazoles no eran eficaces para tratar histomonosis. Lo mismo ocurre con los antibióticos actualmente autorizados que se encuentran en el mercado, así como con los anticoccidianos tales como roxarsona. Por otra parte, los ensayos de vacunación con cepas atenuadas no han llegado a tener éxito en ningún caso.

30 Teniendo en cuenta esta situación, la única profilaxis previsible consiste, o bien en separar las especies, o bien en administrar un vermífugo eficaz contra el protozoario.

35 En otros términos, el problema que se propone resolver la invención consiste en la preparación de una composición eficaz para el tratamiento profiláctico y curativo, en particular de las gallináceas, contra el protozoario *Histomonas meleagridis*.

40 La invención queda ilustrada igualmente de manera más específica en relación con un protozoario flagelado que presenta una fisiología y estructura similares a la de la *Histomonas meleagridis*, o bien el *Trichomonas vaginalis*. El *Trichomonas vaginalis* es un protozoario flagelado que se desarrolla en los humanos con una localización esencialmente uro-genital. Comporta una enfermedad transmisible sexualmente, extendida, designada tricomonosis.

45 En la mujer, los síntomas clínicos se presentan en forma de vulvo-vaginitis aguda con leucorrea espumosa de color amarillo-verde continuada y nauseabunda, así como un prurito vulvar con sensación de quemadura. Las complicaciones son neoplasia cervical y alumbramientos prematuros.

En el hombre, la tricomonosis es asintomática, lo que favorece la diseminación de la enfermedad. Puede presentarse uretritis, epididimita, prostatitis, o incluso esterilidad.

50 Los productos prescritos en la actualidad pertenecen a la familia de los imidazoles y son, en especial, el metronidazol, omidazol, secnidazol, tenonitrozol, y tinidazol. Si bien son eficaces, estos productos deben ser utilizados con ciertas precauciones, en particular, en mujeres encintas o mujeres en periodo de lactancia.

55 De manera general, el problema a resolver es, por lo tanto, preparar una composición que pueda ser eficaz para la profilaxis y tratamiento de las patologías humanas o animales que implican protozoarios flagelados y, en particular, *Histomonas meleagridis* y *Trichomonas vaginalis*, que además no sea citotóxica ni mutagénica.

60 De manera sorprendente, la solicitante ha comprobado y demostrado que el fenogreco presentaba propiedades parasiticidas o parasitoestáticas con respecto a protozoarios anteriormente identificados y, de manera más general, de todos los protozoarios flagelados que pertenecen al Phylum de las Metamonada presentando estructuras y fisiologías similares a las de *Histomonas meleagridis* y *Trichomonas vaginalis*.

65 El documento JP 2008011731 describe una composición que contiene un extracto de fenogreco destinada a tratar la diarrea de los lechones. El documento FR-A-2 833 813 describe una composición que contiene un extracto de fenogreco, destinado al tratamiento de coccidiosis.

La presente invención tiene en principio por objeto la utilización de un extracto de fenogreco para la obtención de una composición destinada al tratamiento preventivo o curativo de las patologías humanas o animales que implican protozoarios flagelados que pertenecen al Phylum de las Metamonada, y en particular a *Histomonas meleagridis* y *Trichomonas vaginalis*.

En una forma de realización ventajosa, los protozoarios flagelados involucrados en la invención pertenecen al Phylum de las Metamonada, incluyendo la clase de las Parabasalia y de las Eofaringia.

En particular, el extracto es utilizado para tratamiento de la histomonosis de las gallináceas, en particular aves de corral y especialmente el pavo, y para el tratamiento de la tricomonosis en el hombre y/o mujer.

El fenogreco, designado con la apelación *Trigonella foenum-graecum* pertenece a la familia de las leguminosas. Originaria de África del norte y de la cuenca mediterránea, esta planta anual es cultivada desde hace mucho tiempo en Asia, especialmente en India y en China. El fenogreco encuentra numerosas aplicaciones en el hombre o en los animales. En particular, puede ser utilizada tradicionalmente como tónico para estimular el apetito y mejorar la digestión, como orexigénico o incluso para aliviar la irritación de las vías respiratorias. Más recientemente, investigaciones y estudios clínicos han demostrado que el fenogreco podría contribuir a la regulación de la proporción de glucosa sanguínea en caso de diabetes.

Según la invención, se pueden utilizar la plana completa o la totalidad de partes de la misma, pueden ser utilizadas.

En una primera forma de realización, el extracto se obtiene a partir del grano. Los granos son ventajosamente granos destegumentados, que son micronizados (dimensiones del orden de 50 μm) o atomizados (dimensiones inferiores a 50 μm).

En una segunda forma de realización, el extracto es obtenido a partir de gérmenes previamente separados del grano después de germinación.

En la práctica, los granos destegumentados o los gérmenes son puestos a macerar bajo agitación a temperatura ambiente, y la solución es centrifugada a continuación, recuperando solamente el sobrenadante.

Se debe comprender que el extracto de fenogreco puede ser utilizado en su propio estado o más ventajosamente formulado en el seno de una composición, especialmente una composición farmacéutica más compleja en presencia de excipientes. Igualmente se puede incorporar en el seno de un complemento alimenticio sólido o una bebida, especialmente una bebida acuosa.

Los ingredientes que se pueden utilizar en la formulación, en particular en forma de complemento sólido son, a título de ejemplo, trigo, maíz, soja, aceite de soja, aceite de palma, o incluso sales minerales, aminoácidos, vitaminas u otras fuentes de carbono, y más generalmente cualquier compuesto que pueda entrar en la composición de alimentos.

Cuando se utiliza en el seno de una composición o un complemento alimenticio o una bebida, el extracto representa entre 0,1 y 5% en porcentaje en peso de la composición, preferentemente entre 0,5 y 5% en porcentaje en peso de la composición.

Cuando el extracto es utilizado para el tratamiento de los parásitos flagelados citados en la presente solicitud de patente, en el animal, y que se presentan en forma de complemento alimentario sólido, representa entre 1 y 3 g/kg, ventajosamente 2 g/kg de complemento.

Cuando el extracto es utilizado para el tratamiento de parásitos flagelados citados en la presente solicitud de patente, en los animales, y se presenta en forma de agua de beber, representa entre 1 y 3 g/l, ventajosamente 2 g/l de la bebida.

Cuando el extracto es utilizado para el tratamiento de los parásitos flagelados citados en la presente solicitud, en el hombre, y se presenta en forma de composición sólida, representa entre 1 y 3 g/kg, ventajosamente 2 g/kg de la composición.

Cuando el extracto es utilizado para el tratamiento de los parásitos flagelados citados en la presente solicitud, en el hombre, y que se presenta en forma de composición líquida, representa entre 100 y 1000 $\mu\text{g/ml}$, ventajosamente 500 $\mu\text{g/ml}$ de la composición.

De modo general, la composición es administrada por vía oral. En este caso, la preparación es administrada en general a razón de 0,5% de la composición.

En el caso de *Trichomonas vaginalis*, el extracto es administrado por vía vaginal.

Como ya se ha indicado, el extracto de fenogreco puede ser utilizado para los tratamientos de las patologías en las que están involucrados los protozoarios flagelados, y especialmente, además de los protozoarios antes citados, los protozoarios de la lista siguiente:

- 5 Tetratrichomonas gallinarum, Trichomonas gallinae que son parásitos intestinales de gallináceas,
Trichomonas foetus, parásitos de las vías genitales del bovino,
Trichomonas equi, parásito intestinal del caballo,
Spironucleus vortens parásito de peces salmónidos,
Hexamita meleagridis parásito de las gallináceas,
- 10 Giardia intestinalis parásito del hombre.

La invención y las ventajas que resultan de la misma, aparecerán fácilmente de los ejemplos siguientes con ayuda de las figuras adjuntas.

- 15 La figura 1 es una representación gráfica de la actividad in vitro del extracto de la invención sobre H meleagridis.
La figura 2 es una representación gráfica que compara la actividad del extracto de la invención sobre H meleagridis con respecto al producto de referencia.

- 20 La figura 3 es una representación gráfica que compara la eficacia del extracto de la invención con respecto a la del dimetridazol sobre el crecimiento de H meleagridis.

La figura 4 es una representación gráfica que compara los efectos del extracto de la invención con los del DMZ sobre la flora bacteriana asociada a H meleagridis.

- 25 La figura 5 es una representación gráfica que compara la eficacia del extracto de la invención con respecto a la del dimetridazol sobre el crecimiento de H meleagridis después de incorporación en medio fresco.

La figura 6 es una representación gráfica que compara los efectos del extracto de la invención con los del DMZ sobre la flora bacteriana asociada a H meleagridis después de 72 horas.

- 30 La figura 7 es una representación gráfica que compra la citotoxicidad del extracto de la invención con el de las moléculas de referencia a las 24 horas (figura 7a) y a las 48 horas (figura 7b).

- 35 La figura 8 es una representación gráfica de la eficacia del extracto de la invención sobre Trichomonas vaginalis a las 24 horas (figura 8a) y a las 72 horas (figura 8b).

1/ Material y procedimiento

1.1. Preparación del extracto.

- 40 El extracto de fenogreco es obtenido por trituración a partir de granos destegumentados micronizados (granos con dimensiones iguales a 50 μ m) y se designa a continuación S520.

1 g de este material en polvo es incorporado en 5 ml de agua estéril (concentración de 200 mg/ml).

- 45 La solución se deja durante una noche con agitación a temperatura ambiente, y después es centrifugada durante 10 min a 16100 g a 4°C.

El sobrenadante es recuperado y centrifugado nuevamente durante 10 min a 16100 g a 4°C.

- 50 El sobrenadante es almacenado a continuación en partes alícuotas de 1 ml a -80°C.

1.2. Cultivo de Histomonas meleagridis

- 55 La cepa de H. meleagridis ha sido aislada a partir de intestino ciego de pavos infectados experimentalmente por huevos de H. gallinarum. Los parásitos con cultivados a 39°C en tubos de cristal sellados, conteniendo 3 ml del medio M199 suplementado. Son reconstituídos nuevamente dos veces por semana. Para ello, se añaden 80 μ l de precultivo a 3 ml del medio fresco previamente calentado en baño maría a 39°C.

- 60 Medio M199 suplementado:
 - M199 42 mL
 - Suero de caballo 5 mL
 - Solución de almidón de arroz 4 mL
- 65 pH= 7,4

Solución de almidón de arroz: Fuente de carbono

- almidón de arroz 0,6 g
- NaCl 0,325 g
- NaHCO₃ 0,05 g
- CaCl₂ 0,015 g
- H₂O hasta completar 50 mL

1.3. Cultivo de la flora bacteriana asociada a *H. meleagridis*.

Extracción de una parte alícuota de cultivo de *H. meleagridis*.
Realización de 4 diluciones en serie (10^{-4} a 10^{-7}) en medio de Triptona Soja líquido.
Dosificación de 20 µl de cada una de las diluciones sobre medio de Triptona Soja gelosado.
Incubación a 37°C: una noche.

1.4. Cultivo de *Trichomonas vaginalis*

La cepa de *T. vaginalis* es facilitada por el ATCC 30243 (cepa de referencia).
Los parásitos han sido cultivados en el medio Hollander filtrado a 35°C. Han sido reconstituidos cada 3 días. Para ello se han añadido 80 µl del cultivo a 3 ml del medio fresco previamente calentado en baño maría a 35°C.

Medio Hollander:

- Tripticasa 20,00 g
 - Extracto de levadura 10,00 g
 - Maltosa 5,00 g
 - Ácido L-ascórbico 1,00 g
 - KCl 1,00 g
 - KHCO₃ 1,00 g
 - KH₂PO₄ 1,00 g
 - K₂HPO₄ 1,00 g
 - FeSO₄ 7H₂O 0,18 g
 - H₂O hasta completar 1000 mL
- pH 6,2

1.5. Numeración de los parásitos

Se hace por conteo en célula de Malassez después de coloración con azul de Trypano 0,4%. Se han contado los 100 campos de la célula.

1.6. Estudio de la actividad anti-histomónica

El S520 es comprobado con diferentes concentraciones. Se realiza una numeración de los parásitos, por triplicado, después de 72 horas de incubación. Se prepara una muestra negativa sustituyendo el extracto por el disolvente solo (agua estéril). Para estudiar el efecto dependiente de la dosis, cada prueba es realizada por triplicado, con concentraciones diferentes, para un conteo de los parásitos a las 24h, 48h y 72h. Se realiza un testigo negativo sustituyendo el extracto por el disolvente solo.

1.7. Estudio de la actividad anti-tricomónica

El S520 ha sido comprobado con 4 concentraciones: 1 mg/mL, 500 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL. Se han realizado numeraciones de los cultivos de *T. vaginalis*, después de 24h, 48h y 72h de incubación con las muestras. Las experiencias han sido realizadas por triplicado.

1.8 Prueba de citotoxicidad

1.8.1 Cultivo de las células MRC5

Las células MRC5 (línea primaria de fibroblastos pulmonares fetales humanos) son cultivadas en cajas de 25 o 75 cm² en medio MEM (Minimum Essential Medium, (Life Technologies Gibco) suplementado, en una estufa a 37°C y % de CO₂

Un volumen de medio MEM de 500 mL es suplementado con suero de vaca fetal (10% final), glutamina 2 mM (5 mL), antibióticos (5 mL de Penicilina-Streptomina, es decir, 0,1 mU/mL, 0,5 mL de Ampicilina, es decir, 10 µg/mL, 0,25 mL de Gentamicina, es decir, 25 µg/mL) y de antifúngicos (5 mL de Fungizone, es decir, 2,5 µg/mL).

Cuando las células llegan a confluencia, son tripsinadas y repartidas en placas de 96 pocillos, con 1 a 2×10^5 células/pocillo. Son incubadas a continuación a 37°C, 5% de CO₂ durante 24h antes de empezar la prueba.

Las placas han sido realizadas en duplicado con una dosificación de las proteínas a las 24 y 48h.

1.8.2. Dosificación de las proteínas

Esta prueba consiste en cultivar células en presencia de los extractos, y después precipitar las proteínas totales para poderlas dosificar.

Las células MRC5 son puestas en presencia de 200 µL de medio MEM suplementado, contenido diferentes concentraciones de los extractos a comprobar. Cada extracto ha sido comprobado con 3 concentraciones: 2 mg/mL, 1 mg/mL y 500 µg/mL. Cada dilución es comprobada por triplicado con la finalidad de poder realizar una media.

Se llevan a cabo dos muestras:

- una muestra negativa: células en presencia de medio MEM suplementado solamente
- una muestra positiva: células en presencia de una mezcla de medios MEM suplementado y de 50% DMSO.

Las placas son incubadas a continuación a 37°C, 5% de CO₂ durante 24 o 48 horas. Después de 24 o 48 horas, el medio que contiene los extractos es eliminado y substituido por medio fresco. Las proteínas totales son precipitadas por 50 µL de ácido tricloroacético 50% (TCA). Después de dos horas de incubación a 4°C los pocillos son lavados con agua del grifo. Una vez la placa seca, se añade sulforhodamina 0,4% (SRB) en cada pocillo para colorear las proteínas. Después de 20 minutos de incubación, los pocillos son enjuagados con ácido acético al 1% y las proteínas son solubilizadas en tampón Tris-Base 10mM, pH 10,5. El contenido de los pocillos es homogeneizado y la densidad óptica es leída a 490 nm.

1.9 Prueba de mutación inversa

La mutagenicidad de los extractos es evaluada con ayuda de un kit comercializado por la sociedad canadiense (EBPI): Muta-Chromoplate™ Kit-S9. Este kit de Chromotest se basa en el ensayo bacteriano más generalmente utilizado y validado de mutación inversa, conocido con el nombre de prueba de Ames. El ensayo utiliza un mutante de Salmonella typhimurium que lleva una mutación del operón que controla la biosíntesis de la histidina. Cuando estas bacterias son expuestas a agentes mutagénicos, bajo ciertas condiciones, aparece una mutación inversa y las bacterias inicialmente auxotrofas para la histidina pasan a ser prototrofas. Los productos son comprobados con o sin activación por S9. Se trata de un homogeneizado de hígado de rata que favorece el metabolismo hepático y permite comprobar el producto, así como sus metabolitos.

La víspera del ensayo, el liofilizado de bacterias es rehidratado con medio de cultivo y después es incubado a 37°C durante 16 a 18 horas. El medio reactivo y la mezcla S9 son preparados según las instrucciones facilitadas en el kit. El medio reactivo es añadido en todos los tubos que contienen extracto a comprobar. El S9 no se añade más que en los tubos en los que el extracto es comprobado con activación. Se añaden 5 µL de Salmonella typhimurium (TA100) en cada tubo de prueba con excepción del control de esterilidad. 200 µL de la mezcla son repartidos en cada pocillo de una placa de 96 pocillos: 1 placa para cada control y 2 placas para cada extracto (una con activación y otra sin activación). Las placas son cerradas mediante tapas, son situadas en bolsas de plástico estériles para mantener la hidrometría, e incubadas 5 días a 37°C.

Se preparan cinco muestras:

- Un control de esterilidad (Blank): únicamente el medio reactivo
- Un control de reversión espontánea sin activación (Background 1): las bacterias y el medio reactivo
- Un control de reversión espontánea con activación (Background 2): las bacterias, la mezcla S9 y el medio reactivo
- Un control con un mutágeno sin activación (Standard Mutagen 1): las bacterias, una sustancia mutagénica (azida de sodio NaN₃) y el medio reactivo
- Un control con un mutágeno y con activación (Standard Mutagen 2): las bacterias, una sustancia mutagénica (2-amino-antraceno), la mezcla S9 y el medio reactivo

2/ Resultados

2.1. Actividad anti-histomónica de S 520

Tal como se muestra en la figura 1, el S 520 es histomonicida a partir de 1 mg/mL y de 24 horas. Ralentiza la proliferación del parásito a 500 µg/mL (a 72h: 51% de inhibición). El efecto es dependiente de la dosis.

La eficacia ha sido comparada igualmente a la de las sustancias utilizadas para la lucha contra la histomonos: el PrismaFlag® (Santamix), el Santagib® (Prisma) y el Nifursol (Figura 3). Los resultados se han explicado en

porcentaje de aumento con respecto a la muestra.

Tal como resulta de la figura 2, el PrismaFlag® es histomonostático a partir de 1 mg/mL (a 72h: 88% de inhibición con 2 mg/mL y 50% de inhibición en 1 mg/mL). No se pudo poner en evidencia ningún efecto significativo del Santagib® sobre la proliferación de *H. meleagridis*. El Nifursol es ligeramente histomostático a 2 mg/mL (a 72h: 38% de inhibición).

A concentraciones iguales, el S520 es el extracto más eficaz para inhibir la proliferación de *H. meleagridis*.

El S520 ha sido finalmente comprobado en paralelo con el Dimetridazol (DMZ). Los resultados se han representado en la figura 3. Tal como se muestra en esta figura, el DMZ es una sustancia parasitocida a 25 µg/mL, mientras que el DMZ es parasitostático.

Los efectos de diferentes concentraciones de S520 y de DMZ sobre la flora bacteriana asociada después de 48h de cultivo se comparan a continuación. Los resultados se han expresado en número de bacterias por mL (figura 4). El extracto S520 es histomonicida desde 1 mg/mL. No tiene efecto sobre la flora bacteriana asociada. El Dimetridazol es histomonicida desde 25 µg/mL a 72h. Por el contrario, es bactericida a partir de 400 µg/mL.

Después de 72h de tratamiento con el S520 y el DMZ, los parásitos han sido puestos en un medio fresco durante 96h para analizar el efecto histomonicida (figura 5).

S520: Sin recuperación del cultivo en 2 mg/mL pero recuperación en 1 mg/mL y 500 µg/mL. Esto confirma que el S520 a 2 mg/mL es histomonicida. A 1mg/mL algunos parásitos sobreviven, sería, por lo tanto, histomonostático y no histomonicida.

DMZ: sin recuperación del cultivo a 1 mg/mL y 400 µg/mL pero con recuperación a 25 µg/mL, pero (solamente aproximadamente 30% de crecimiento con respecto a la muestra) y a 12,5 µg/mL.

Esto confirma que el DMZ es histomonicida a partir de 400 µg/mL. Solamente sería histomonostático a 25 µg/mL, puesto que la recuperación del cultivo indica que algunos parásitos han sobrevivido al tratamiento. Se debe observar que a la concentración de 400 µg/mL, el DMZ tiene acción sobre la flora asociada (figura 4).

El estudio efectuado durante 72 horas sobre la flora bacteriana asociada muestra que las diferentes concentraciones de S520 no tienen efecto alguno sobre esta flora (figura 6).

2.2 Prueba de citotoxicidad

Prueba efectuada sobre cultivos de células MRC5.

El extracto ha sido comparado con tres sustancias de referencia: PrismaFlag®, Santagib® y Nifursol.

Los inventores han sometido a prueba 4 concentraciones de cada uno de los extractos: 2 mg/mL, 1 mg/mL, 500 µg/mL y 100 µg/mL (figuras 7a y 7b).

Solamente el PrismaFlag® se considera como citotóxico, puesto que comporta un crecimiento celular inferior a 60% con relación a la muestra en 500 µg/mL y ello desde las 24 horas de incubación con las células. El S520 no es tóxico para las células humanas en cultivo. Lo mismo ocurre para el Santagib® y Nifursol.

2.3 Prueba de mutación inversa

Para que el S520 pueda ser utilizado en ganadería de aves destinadas a la producción de carne, es indispensable asegurarse de que no es mutagénico (y por lo tanto cancerígeno). Se han comprobado, por lo tanto, el S520 a 2 mg/mL, 1 mg/mL y 500 µg/mL.

Los resultados se indican en la siguiente tabla:

		Antecedentes	S520		
			2 mg/mL	1 mg/mL	500 µg/mL
% de mutaciones inversas	Sin activación	54,2	14,6	7,3	10,4
	Con activación	84.4	67.7	67.7	60.4

Sin activación por el S9, las relaciones de mutación inversa espontánea son de 54,2%. Para las tres concentraciones de S520 comprobadas, se obtiene una relación de mutación inversa espontánea inferior.

Con activación por el S9, las relaciones de mutación inversa espontánea son de 84,4%. En este caso, todavía el S520 facilita una relación inferior.

Por lo tanto, el S520, activado o no, no es mutagénico.

2.4 Actividad anti-Trichomonas vaginalis del S520

- 5 Se ha preparado para cada prueba un medio mixto de Hollander con la adición de parásitos:
- 24 volúmenes de medio Hollander suplementado a 35°C + 1 volúmenes de cultivo de *T. vaginalis*.
- 10 El S520 ha sido probado con 4 concentraciones diferentes: 1 mg/mL, 500 µg/mL, 100 µg/mL y 50 µg/mL.
- Se han realizado numeraciones de cultivos de *T. vaginalis* después de 24h, 48h y 72h.
- 15 El experimento ha sido realizado por triplicado.
- Los resultados (figuras 8 y 9) demuestran que el S520 es tricomonocida a partir de 500 µg/mL (1% de crecimiento con respecto a la muestra a 72h).
- 20 Es tricomonostático a partir de 100 µg/mL (5% de crecimiento con respecto a la muestra a 72h).
- La invención y las ventajas que resultan de ella se deducirán de la descripción anterior, observándose, en particular, la eficacia del extracto de fenogreco, en particular cuando se presenta en forma de extracto de grano micronizado, destegumentado sobre los parásitos flagelados.
- 25 Por lo tanto, el extracto puede ser utilizado para el tratamiento de patologías, tales como, en particular, histomonosis en las gallináceas, especialmente el pavo. Puede ser utilizado igualmente para el tratamiento humano de la tricomonosis. En todos los casos, se muestra, no solamente eficaz, sino igualmente no mutagénico y no citotóxico.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un extracto de fenogreco para la obtención de una composición destinada al tratamiento preventivo o curativo de las patologías humanas o animales que implican protozoarios flagelados pertenecientes al Phylum de las Metamonada.
2. Utilización, según la reivindicación 1, caracterizada porque las patologías implican *Histomonas meleagridis* y *Trichomonas vaginalis*.
- 10 3. Utilización, según la reivindicación 1, para el tratamiento de la histomonosis de las gallináceas, en particular el pavo.
4. Utilización, según la reivindicación 1, para el tratamiento de la tricomonosis en el hombre y/o la mujer.
- 15 5. Utilización, según la reivindicación 1, caracterizada porque el extracto es obtenido a partir de granos destegumentados, micronizados o atomizados.
6. Utilización, según la reivindicación 1, caracterizada porque el extracto es obtenido a partir de gérmenes previamente separados del grano después de germinación.
- 20 7. Utilización, según la reivindicación 1, caracterizada porque el extracto es un extracto acuoso.
8. Utilización, según la reivindicación 1, caracterizada porque el extracto es incorporado al seno de un complemento alimentario o de una bebida y representa entre 0,1 y 5% en porcentaje en peso de la composición,.
- 25 9. Utilización, según la reivindicación 1, caracterizada porque el parásito es escogido dentro del grupo que comprende *Tetratrichomonas gallinarum*, *Trichomonas gallinae*, *Trichomonas foetus*, *Trichomonas equi*, *Spironucleus vortens*, *Hexamita meleagridis*, *Giardia intestinalis*.

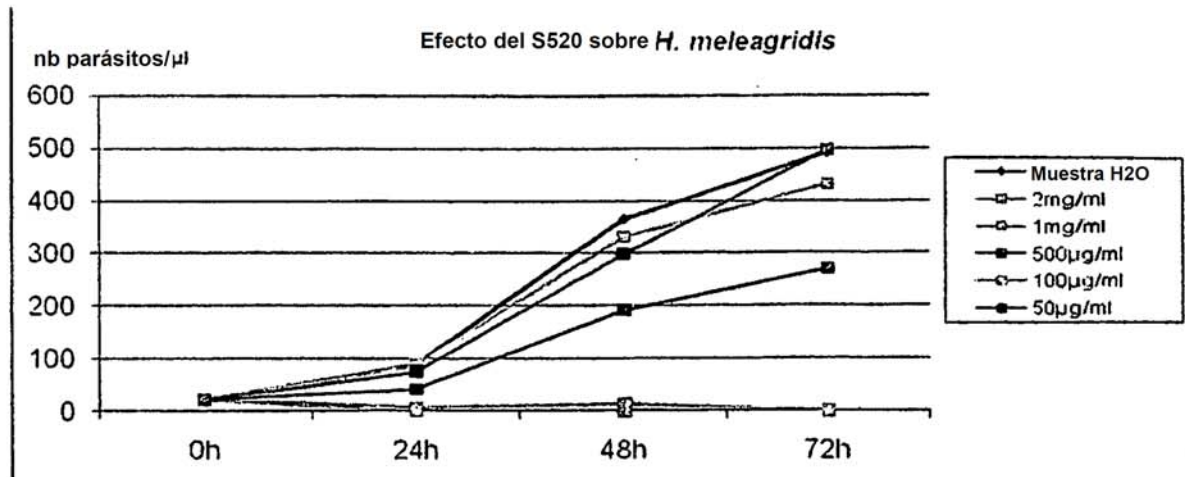


Figura 1

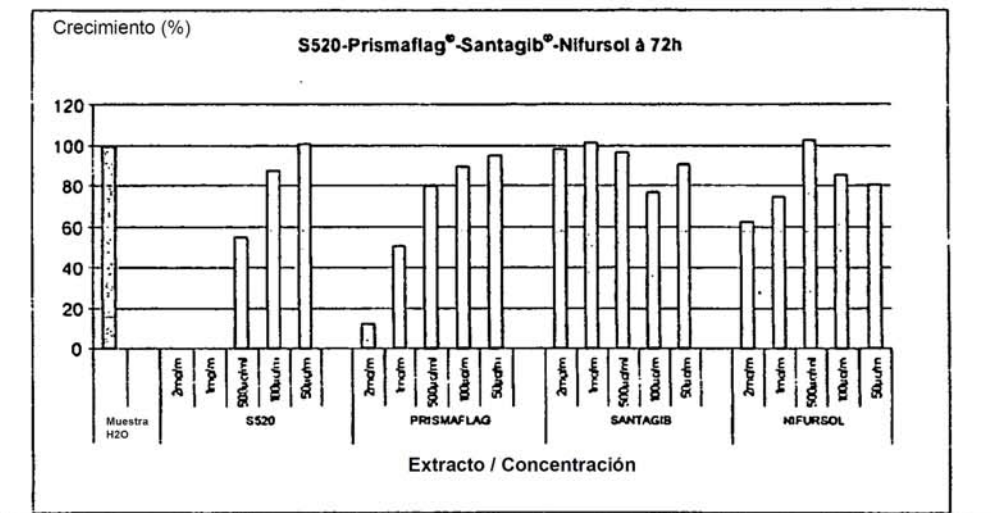


Figura 2

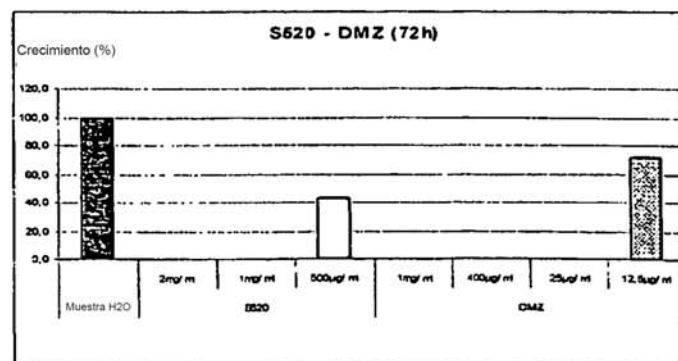


Figura 3

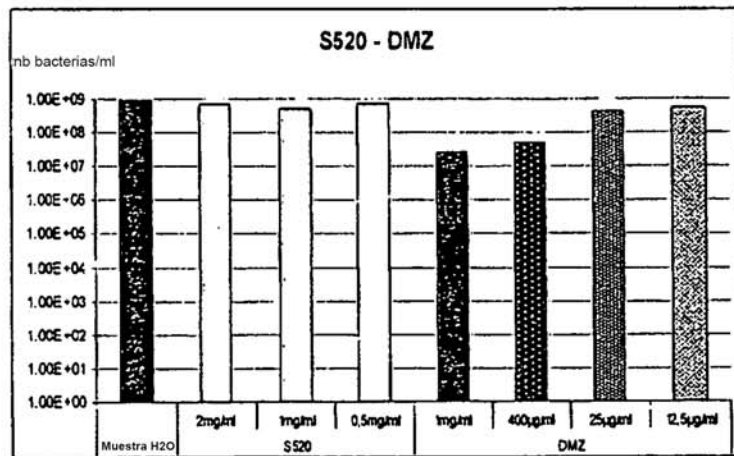


Figura 4

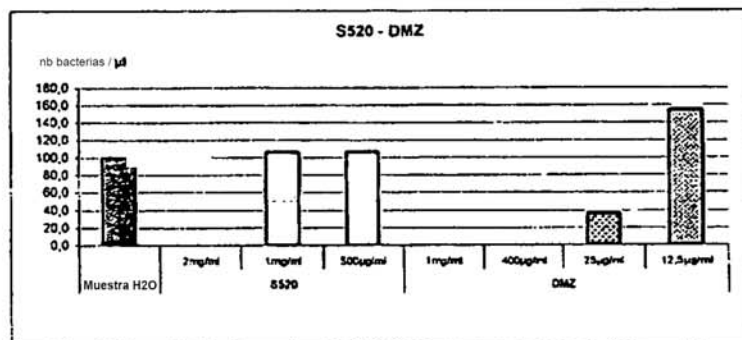


Figura 5

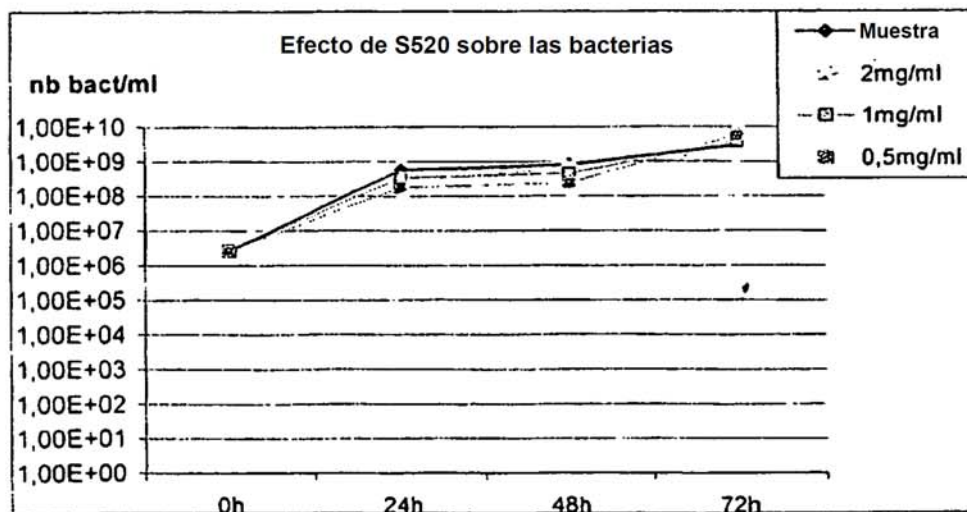


Figura 6

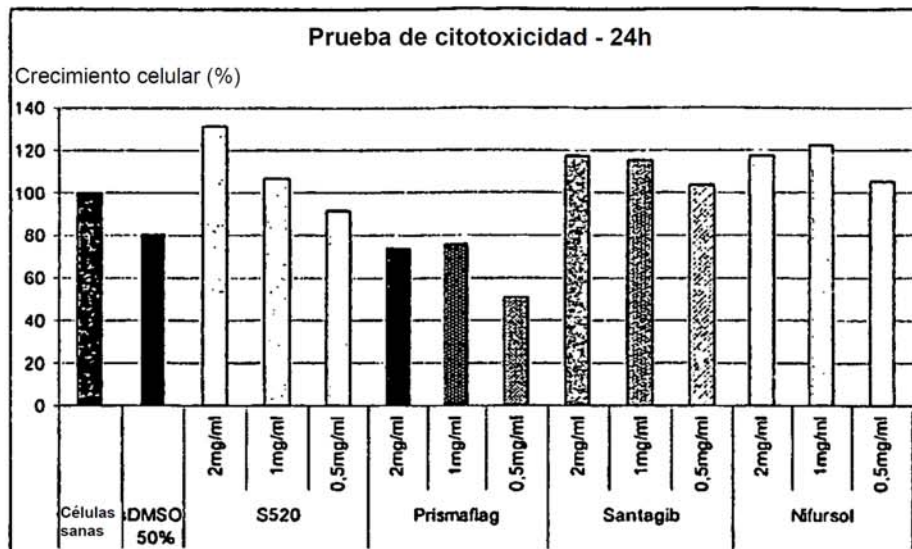


Figura 7a

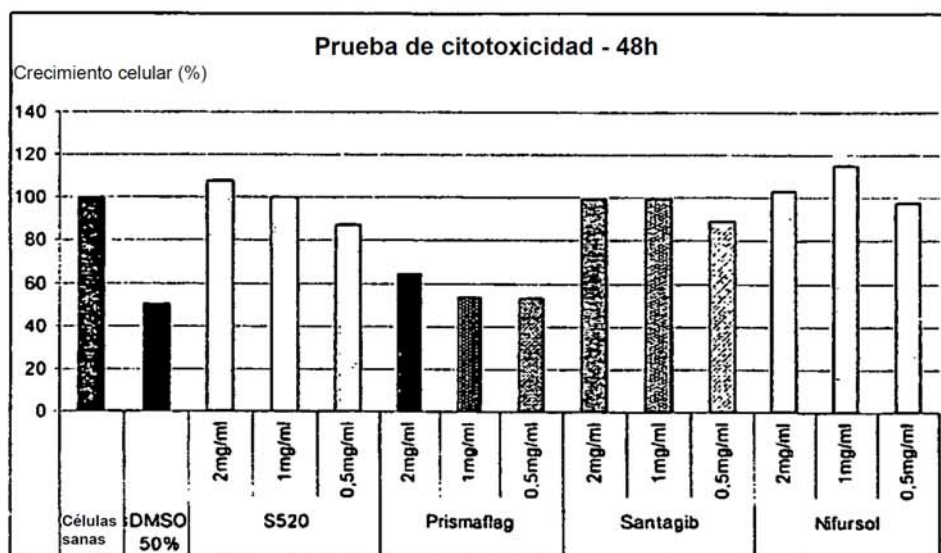


Figura 7b

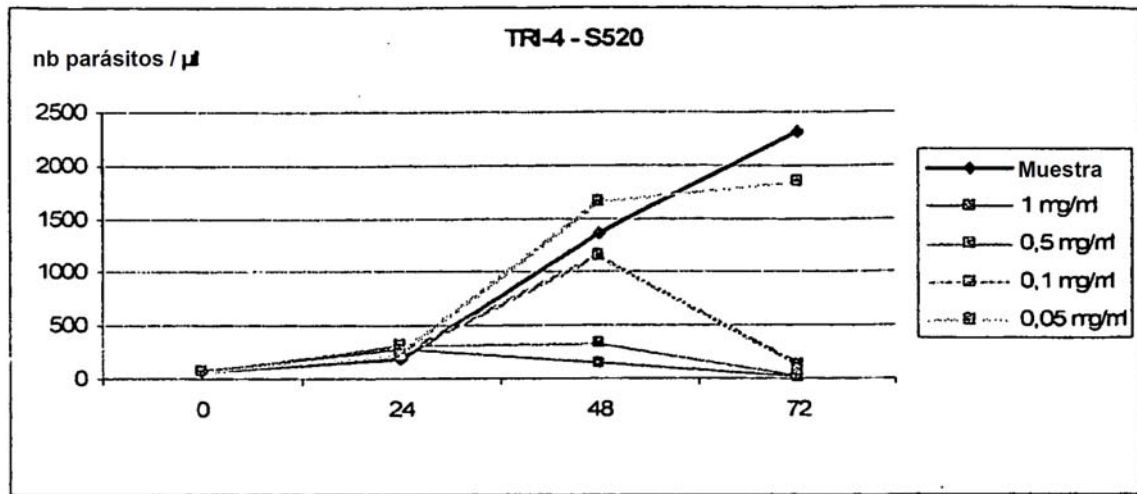


Figura 8a

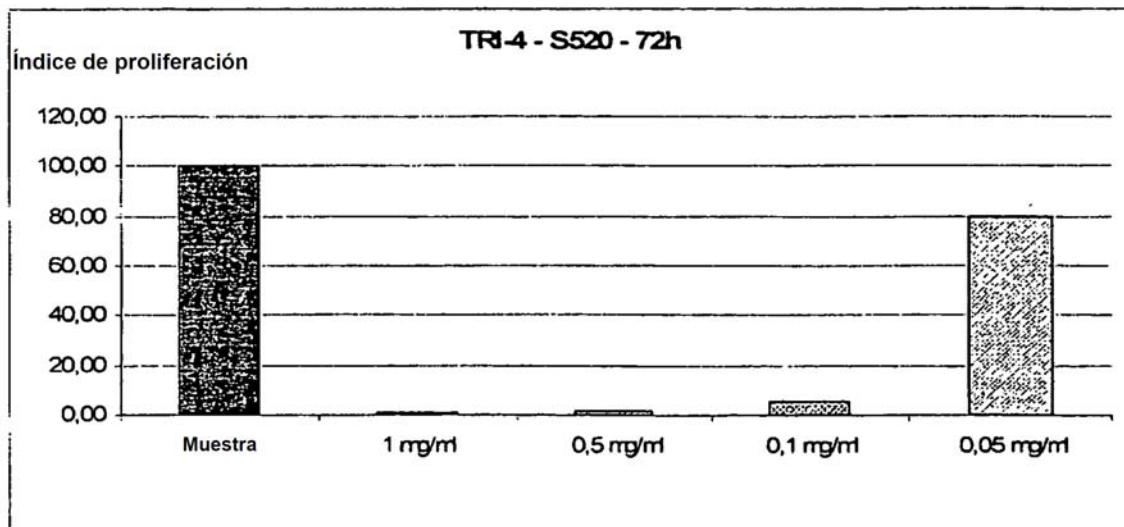


Figura 8b