

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 406**

51 Int. Cl.:

A01N 65/00 (2009.01)

A61K 36/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2011 PCT/IB2011/053962**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012 WO12127287**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2011 E 11861334 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2685996**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratar la malaria resistente a múltiples fármacos**

30 Prioridad:

18.03.2011 US 201161454246 P

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

09.01.2017

73 Titular/es:

**FEBRIS BIO-TECH LIMITED (25.0%)
Suite 405 24 Garden Place
3204 Hamilton, NZ;
SMITH, GARTH SELWYN (25.0%);
ZHANG, LIXIN (25.0%) y
DAI, HUANQIN (25.0%)**

72 Inventor/es:

**SMITH, GARTH SELWYN;
ZHANG, LIXIN y
DAI, HUANQIN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 596 406 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

Composiciones y métodos para tratar la malaria resistente a múltiples fármacos

Campo de la invención

5 Se describe un método para tratar a un individuo de una infección malárica. En particular, se describe un método para tratar a un individuo infectado con una especie resistente a fármacos antimaláricos de *Plasmodium*, que incluye administrar al individuo que necesita tal tratamiento una composición que contiene uno o más compuestos di- o triterpénicos. Se ha descubierto que los compuestos potentes y eficaces obtenidos del fruto de *Siraitia grosvenorii* (Luo Han Guo) y de las hojas de Stevia (*Stevia rebaudiana*), lo que incluye las combinaciones de los mismos, contienen cantidades eficaces de compuestos de di- o triterpenos, y se describen éstos. En una realización, la
10 la composición inventiva se administra de manera oral en una forma ingerible sólida o líquida.

Antecedentes

15 La malaria es una enfermedad infecciosa devastadora, y cada año se dan 350-500 millones de casos en todo el mundo. Como problema sanitario importante en Asia, África, Oriente Medio, y Centro- y Sudamérica, alrededor del 41% de la población mundial vive en áreas en las que se transmite la malaria. Y aún más trágicamente, la malaria provoca el 11% de todas las muertes infantiles en los países en desarrollo. Por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que en 2008 la malaria provocó prácticamente un millón de muertes, principalmente entre niños africanos. En África muere un niño de malaria cada 45 segundos, y la enfermedad provoca el 20% de todas las muertes infantiles.

20 Se conocen tratamientos antimaláricos, principalmente terapias farmacológicas. Las quininas (o la clase de quinolinas), p.ej. cloroquina, mefloquina, son muy conocidas como agentes terapéuticos. También se han desarrollado otras combinaciones farmacológicas. El mejor tratamiento disponible actualmente, en particular para la malaria por *P. falciparum*, es la terapia de combinación basada en artemisinina ("TCA"). La artemisinina procede de una planta, *Artemisia annua*, que pertenece a la familia Asteraceae.

25 Desafortunadamente, han surgido dos problemas fundamentales en la lucha contra la malaria, concretamente, la resistencia farmacológica y el coste elevado de los tratamientos farmacológicos y médicos. Existe claramente una necesidad urgente de terapias alternativas que eviten el desarrollo de la resistencia farmacológica de *Plasmodium*, y que reduzcan drásticamente los costes asociados al tratamiento de la malaria. Sería una contribución a la técnica médica proporcionar una composición antimalárica fácilmente disponible y accesible administrable en diversas formas.

30 Según los datos de la OMS, si se desarrolla la resistencia a las artemisininas y se extiende a otras áreas geográficas extensas, como ha ocurrido antes con cloroquina y sulfadoxina-pirimetamina (SP), las consecuencias para la salud pública podrían ser graves, ya que es posible que no haya medicinas antimaláricas alternativas disponibles en un futuro próximo.

35 Además, suponiendo que la misma concentración del extracto del fruto de Luo Han que contiene la composición de la presente invención sea tan eficaz como la de los derivados de artemisinina, el coste del extracto de Luo Han sería solamente una fracción del coste por tratamiento con artemisinina para curar la malaria. Se podría decir lo mismo de los extractos basados en hojas de Stevia. Incluso si fuera necesaria una cantidad sustancialmente mayor de los ingredientes activos obtenidos de Luo Han y/o Stevia para los tratamientos antimaláricos, el ahorro de costes en comparación con las terapias comercializadas actualmente sería inmenso.

40 Ciertos glucósidos de di- y triterpenos se conocen como edulcorantes, pero no se ha informado del uso de tales compuestos para el tratamiento de la malaria en un sujeto humano.

45 Sería una contribución adicional a la técnica médica proporcionar un método de tratamiento de la malaria administrando una composición que contiene uno o más compuestos de di- o triterpenos a un paciente humano que necesita tal tratamiento. Sería una contribución adicional a la técnica proporcionar un método para tratar la malaria resistente a fármacos administrando a un paciente humano que necesita tal tratamiento una cantidad eficaz de la composición de la invención en forma de un extracto que contiene uno o más compuestos de di- o triterpenos. El documento WO 01/56959 A1 describe una sustancia que incluye las estructuras químicas de biciclo[3.2.1]octano o las estructuras químicas de kaureno para el uso en un suplemento alimenticio o como constituyente en un medicamento para el tratamiento de la diabetes mellitus no insulino dependiente, la hipertensión y/o el síndrome metabólico. El documento US 2010/0272838 A1 describe un método para el tratamiento y/o la profilaxis de una
50 infección viral en un sujeto, en el que el método comprende las etapas de proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un extracto del fruto de *Siraitia grosvenorii* Swingle y administrar la composición al sujeto. El fruto del que se obtiene el extracto es Luo Han Guo.

Sumario de la invención

55 Se ha descubierto que los compuestos activos potentes y eficaces obtenidos del fruto de *Siraitia grosvenorii* (Luo

Han Guo) y de las hojas de Stevia (*Stevia rebaudiana*), lo que incluye las combinaciones de los mismos, contienen cantidades eficaces de uno o más di- o triterpenos. Estos compuestos potentes, que incluyen los mogrósidos, se pueden extraer del fruto de Luo Han. En una realización, suponiendo que la misma concentración del extracto de Luo Han sea en general tan eficaz como la de los derivados de artemisinina, el coste del extracto de Luo Han sería solamente una fracción del coste por tratamiento para curar la malaria. Se pueden extraer otros compuestos potentes, que incluyen rebaudiósido A, de las hojas de Stevia.

Se describe un método para tratar a un individuo de una infección malárica, que comprende administrar al individuo que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un extracto de hojas de Stevia que contiene glucósidos de esteviol y un vehículo aceptable. La presente invención proporciona una composición que comprende un extracto de hojas de Stevia que contiene glucósidos de esteviol y un vehículo aceptable para el uso en el tratamiento de una infección malárica.

En una realización adicional, se puede incluir un extracto de frutos de Luo Han en dicha composición para el uso en el tratamiento de una infección malárica. Además, se describe un método para tratar a un individuo de una infección malárica, que comprende administrar al individuo que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un extracto de frutos de Luo Han y un vehículo aceptable.

Además, se describe un método para tratar a un individuo de una infección malárica, que comprende administrar al individuo que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende al menos un diterpeno o un triterpeno, y un vehículo aceptable.

Además, se describe un método para tratar a un individuo de una infección malárica, que comprende administrar al individuo que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende rebaudiósido A, un extracto de frutos de Luo Han y un vehículo aceptable.

En otra realización, dicha composición comprende además un compuesto seleccionado del grupo que consiste en mefloquina, halofantrina, artesunato, arteméter, arteéter, cloroquina, lumefantrina, primaquina, sulfadoxina, sulfaleno, pirimetamina, doxiciclina, tetraciclina, azitromicina, proguanilo, cicloguanilo, dapsona, artemisinina, dihidroartemisinina y atovacuona, pero preferiblemente artemisinina. En otra realización, el extracto de hojas de Stevia contiene uno o más glucósidos de diterpenos o triterpenos seleccionados del grupo que consiste en rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, dulcósido B, rubusósido, esteviósido, esteviolbiósido, siamenósido I, grosmomósido I, y combinaciones de los mismos. En otra realización, el extracto de frutos de Luo Han contiene uno o más glucósidos de diterpenos o triterpenos seleccionados del grupo que consiste en mogrósido II, mogrósido III, mogrósido IV, mogrósido V, y las combinaciones de los mismos.

En otra realización, se proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de rebaudiósido A, una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto de frutos de Luo Han, y un vehículo aceptable, en la que el rebaudiósido A está presente en un intervalo del 1% al 99% en peso de la composición total, y el extracto de frutos de Luo Han está presente en un intervalo del 1% al 99% en peso de la composición total, y en la que la composición comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en mefloquina, halofantrina, artesunato, arteméter, arteetér, cloroquina, lumefantrina, primaquina, sulfadoxina, sulfaleno, pirimetamina, doxiciclina, tetraciclina, azitromicina, proguanilo, cicloguanilo, dapsona, artemisinina, dihidroartemisinina, atovacuona, y combinaciones de los mismos.

Descripción breve de los dibujos

La FIG. 1 representa una curva dosis-respuesta (porcentaje de crecimiento frente a concentración de ingrediente activo) que describe una realización de un extracto de frutos de Luo Han (es decir, la fracción de acetato de etilo, EtOAc: "Compuesto A") usado para tratar *P. falciparum* 7G8 (una cepa de ensayo resistente a fármacos, obtenida del Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4), Manassas, Virginia, EE.UU.) *in vitro*, mediante el uso de cloroquina ("CQ") como control positivo.

La FIG. 2 representa una curva dosis-respuesta (porcentaje de inhibición del crecimiento frente a la concentración de fármaco) que describe el efecto de CQ sobre clones 3D7 de *P. falciparum* en una realización como cepa de ensayo sensible a fármacos.

La FIG. 3 representa una curva dosis-respuesta (porcentaje de inhibición del crecimiento frente a la concentración de fármaco) que describe el efecto de CQ sobre clones Dd2 de *P. falciparum* resistentes a múltiples fármacos en una realización como cepa de ensayo resistente a fármacos.

Descripción detallada

Los di- y triterpenos potentes y eficaces descritos en la presente memoria se pueden incluir en una composición para el uso en el tratamiento de infecciones maláricas. Los compuestos activos de di- y/o triterpenos potentes y eficaces, que incluyen mogrósidos, se pueden extraer del fruto de Luo Han. Los compuestos activos de di- y/o triterpenos potentes y eficaces, que incluyen rebaudiósido A, se pueden extraer de las hojas de Stevia. De manera alternativa o

adicional, tales compuestos de di- y/o triterpenos, que incluyen mogrósidos y/o rebaudiósido A, se pueden extraer o aislar de cualquier fuente natural o botánica adecuada.

En una realización alternativa, la composición que contiene uno o más compuestos de di- o triterpenos para el uso en el tratamiento de infecciones maláricas puede incluir además una lactona sesquiterpénica, p.ej. artemisinina.

- 5 Preferiblemente, la composición contiene ingredientes que se considera que son seguros y eficaces para el consumo y uso humano.

La expresión "cantidad eficaz", tal como se usa en la presente memoria, significa una cantidad o concentración de un compuesto según la presente invención que es eficaz dentro del contexto de su administración o uso, que puede ser inhibitorio, profiláctico y/o terapéutico. En general, es preferible administrar la composición en una forma administrable de manera oral, pero ciertas formulaciones se pueden administrar por medio de una vía parenteral, intravenosa, intramuscular, transdérmica, bucal, subcutánea, por supositorios u otras.

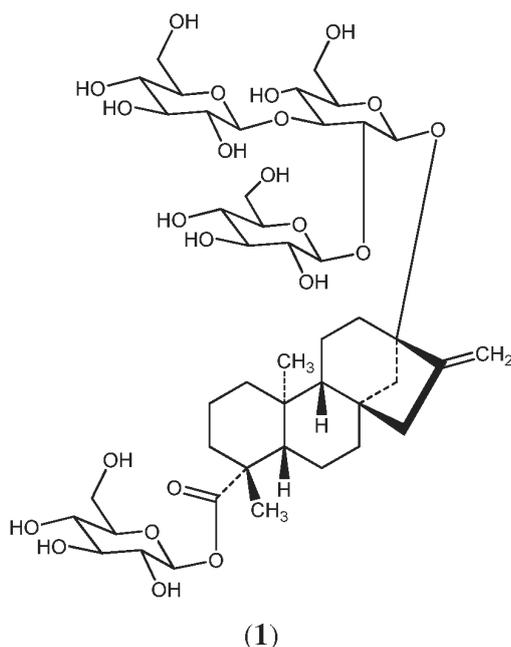
Las infecciones maláricas están provocadas por parásitos del género *Plasmodium*. Los parásitos se propagan a las personas por medio de mosquitos *Anopheles* infectados, denominados "vectores de la malaria".

15 Existen cuatro tipos de malaria humana: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, y *Plasmodium malariae*. Según la OMS, en años recientes, algunos casos humanos de malaria se han dado también con *Plasmodium knowlesi*, una malaria que afecta a monos que se da en ciertas áreas forestales del sudeste de Asia.

Los terpenos constituyen una clase amplia de materiales botánicos naturales. Los monoterpenos incluyen dos unidades de isopreno, y tienen la fórmula general $C_{10}H_{16}$. Los terpenos pueden ser acíclicos o cíclicos, aunque la mayoría de especies bioactivas incluyen uno o más anillos, que pueden estar condensados o tener un puente. Los sesquiterpenos poseen tres unidades de isopreno e incluyen artemisinina y derivados de la misma, una clase conocida de lactona con puentes peróxido. Los diterpenos, que están compuestos de cuatro unidades de isopreno, abarcan un grupo más amplio de compuestos biológicamente importantes, que incluyen esteviol, forskolina, y similares. Finalmente, los triterpenos, que están compuestos de seis unidades de isopreno, representan un grupo aún más amplio de compuestos que tienen en general un esqueleto de carbono C_{30} o una estructura de anillos. El escualeno, y otros esteroides biológicos, surgen a partir de esta clase, al igual que los compuestos relacionados con cucurbitano. Los triterpenos constituyen una clase de compuestos que son numerosos y están presentes de manera generalizada en la naturaleza, que se dan principalmente en las plantas. Los cucurbitanos son triterpenos que se hallan en muchas plantas, y algunos de estos compuestos, tales como cucurbitacinas, mogrósidos I-VI, momordicinas, y similares, son productos fitoquímicos importantes.

Los diterpenos y triterpenos, y sus derivados, que incluyen los derivados de glucósidos, que se contemplan como útiles para las presentes composiciones, incluyen, pero sin limitación: rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, dulcósido B, rubusósido, esteviósido, esteviolbiósido, mogrósido II, mogrósido III, mogrósido IV, mogrósido V, siamenósido I, grosmomósido I, y las combinaciones de los mismos. Además, según sea adecuado, también se contempla el uso de sales, solvatos, y profármacos de estos ingredientes.

Los glucósidos de esteviol están contenidos en extractos purificados de las hojas de la hierba sudamericana *Stevia rebaudiana*. Actualmente, se cultiva *Stevia* y se usa en los alimentos en muchos lugares del mundo. El rebaudiósido A (denominado a menudo "rebianna" o "Reb A") y esteviósido son los componentes dominantes de los extractos, y ambos son diterpenos. Reb A se denomina éster de β -D-glucopiranosilo de ácido (14 α)-13-[(2-O- β -D-glucopiranosil-3-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosil)oxil]kaur-16-en-19-oico. La estructura de Reb A se representa en el compuesto de fórmula (1):



El esteviósido posee un grupo glucosilo menos en la posición C-13, de manera específica, carece del grupo 3-O-glucopiranosilo de Reb A.

5 Se sabe que tanto Reb A como esteviósido son edulcorantes no nutritivos, a niveles comparativos de alrededor de 300 veces más dulces que la sacarosa, y 350-450 veces más dulces que la sacarosa, respectivamente. En la actualidad, los glucósidos de esteviol se usan principalmente como edulcorantes y potenciadores del sabor sin calorías.

Al rebaudiósido A se le ha concedido el estado de notificación GRAS (en general considerado seguro) de la Administración de Fármacos y Alimentos de EE.UU. (números 252 y 253).

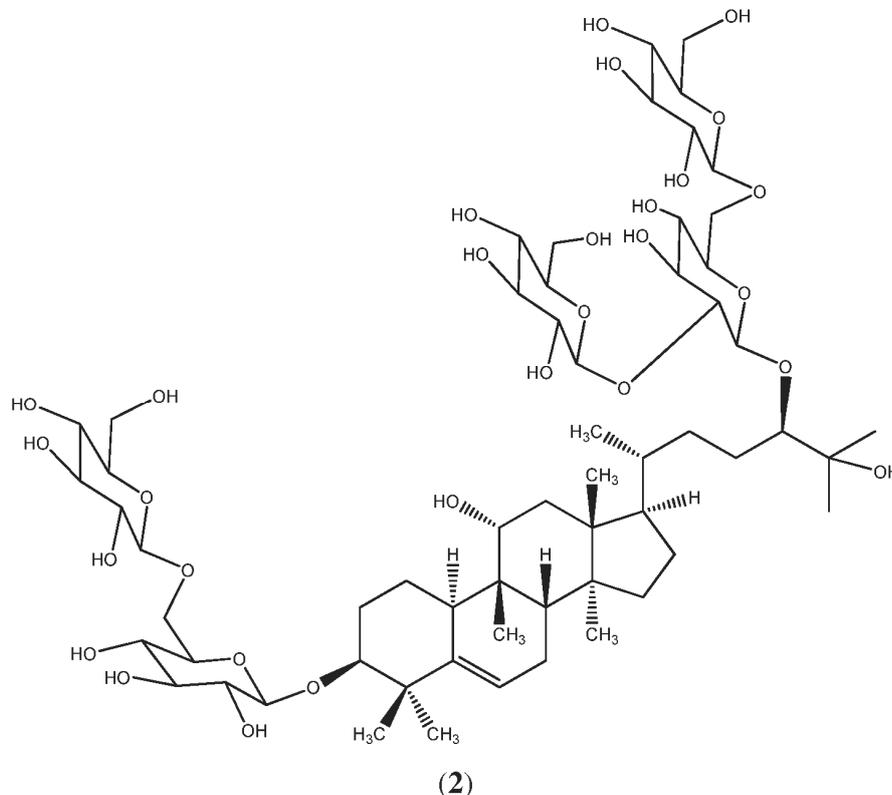
10 En los estudios metabólicos en seres humanos, tanto esteviósido como Reb A se convierten en esteviol, que después se conjuga con ácido glucurónico para formar glucurónido de esteviol, y se excreta en la orina durante el metabolismo de fase II. La semivida ($t_{1/2}$) para ambos glucósidos en seres humanos es de aproximadamente 14 horas. Además, a las dosis usadas en la presente memoria, Reb A no exhibe efectos hemodinámicos adversos o efectos de disminución de la glucosa en la sangre. Los únicos efectos farmacológicos informados de los glucósidos
 15 de esteviol fueron observaciones a tasas de dosis muy elevadas (alrededor de 750 a 1500 mg/día) de una tensión arterial disminuida y la disminución de los niveles de glucosa en la sangre.

Se puede usar una composición que contiene Reb A, y un vehículo aceptable, para el tratamiento de las infecciones maláricas. Se espera además que las combinaciones de los compuestos activos seleccionados del grupo que
 20 consiste en rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, dulcósido B, rubusósido, esteviósido, y esteviolbiósido, cuando se formulan con un vehículo farmacéuticamente aceptable, sean terapéuticamente eficaces para el tratamiento de la malaria en un paciente humano, lo que incluye las infecciones resistentes a fármacos del género *Plasmodium*.

El fruto de Luo Han (en chino, *luo han guo*), o fruta del monje, lo produce una planta (*Siraitia grosvenorii*), que
 25 solamente crece en la zona norte de la provincia de Guangxi, en el sur de China. La planta es una enredadera perenne de la familia Cucurbitaceae (pepino o melón). Este fruto se usa de manera generalizada como alimento dietético y medicinal en toda China y sudeste de Asia, y se ha cultivado para tal uso durante siglos. En China, los frutos se usan con frecuencia como ingrediente principal en "bebidas refrescantes o té". Tradicionalmente, el fruto se usó para hacer una decocción con agua caliente y se bebía para el tratamiento de dolencias de garganta y pulmón. Además, el jugo del fruto de Luo Han es muy dulce, y algunos de los componentes del fruto de Luo Han se han
 30 usado como edulcorantes.

En la presente memoria se describen extractos del fruto de Luo Han. Los componentes principales de los extractos del fruto de Luo Han son glucósidos del triterpeno cucurbitano conocidos como mogrósidos, de manera específica los mogrósidos II, III, IV, V, y VI, junto con flavonoides y melanoidinas. El sabor dulce del fruto de Luo Han procede principalmente de los mogrósidos, esp. mogrósido V, que constituyen un grupo de glucósidos de triterpenos que
 35 constituyen aprox. del 0,5% al 1% en peso del fruto seco. El mogrósido V se ha identificado como el componente terpenoide principal y el componente de glucósido principal, y mediante el uso de extracción y de otros medios de aislamiento se puede obtener a niveles de alrededor del 30-60% en peso, por ejemplo. Además, los extractos de frutos de Luo Han pueden contener >45% en peso hasta alrededor del 48% en peso total de mogrósidos, lo que

incluye los derivados y/o metabolitos de mogrosídeos. El mogrosídeo V se denomina (3 β ,9 β ,10 α ,11 α ,24R)-3-[(6-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosil)oxi]-11,25-dihidroxi-9-metil-19-norlanost-5-en-24-il-O- β -D-glucopiranosil-(1-2)-O-[β -D-glucopiranosil-(1-6)]- β -D-glucopiranosídeo. La estructura del mogrosídeo V se representa en el compuesto de fórmula (2):



5 Se sabe que los mogrosídeos son edulcorantes no nutritivos, y el mogrosídeo V es hasta 300 veces más dulce que el azúcar en su forma pura.

A un extracto de frutos de Luo Han útil que contiene Mogrosídeo V se le ha concedido el estado de notificación GRAS (en general considerado seguro) de la Administración de Fármacos y Alimentos de EE.UU. (número 301).

10 Un ejemplo de un derivado o metabolito de mogrosídeo es el 11-oxo-mogrosídeo V, que también puede estar presente en cantidades sustanciales en los extractos de frutos de Luo Han descritos en la presente memoria, hasta alrededor del 8% en peso.

15 Se espera además que un extracto de frutos de Luo Han, cuando se formula con un vehículo farmacéuticamente aceptable, sea terapéuticamente eficaz para el uso en el tratamiento de la malaria en un paciente humano, lo que incluye las infecciones resistentes a fármacos del género *Plasmodium*.

20 La artemisinina se extrae y aísla de *Artemisia annua* (un pequeño arbusto que pertenece a la familia Asteraceae y que se halla en las zonas templadas de Asia; habitualmente conocido como ajeno dulce). Otros derivados de artemisinina útiles para las realizaciones descritas en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, arteméter, arteéter, dihidroartemisinina, artesunato, y similares. Como se discutió anteriormente, un foco importante de la investigación medicinal en la malaria son las terapias de combinación basadas en artemisinina ("TCA"). Estas terapias combinan derivados de artemisinina con fármacos complementarios. Por ejemplo, una combinación bien conocida incluye arteméter y lumefantrina en una proporción 1:6 p/p (también conocida como co-arteméter). La lumefantrina es (+/-)-2-dibutilamino-1-[2,7-dicloro-9-(4-clorobenciliden)-9,11-fluoren-4-il]etanol (también conocido como benflumetol y dl-benflumelol), y se puede combinar con otros ingredientes en las realizaciones de la invención.

25 Sin embargo, no se ha informado de las combinaciones de artemisinina o sus derivados con di- o triterpenos. En particular, no se ha informado de las combinaciones de artemisinina o sus derivados con un glucósido de diterpeno y/o un glucósido de triterpeno para el uso en los tratamientos antimaláricos.

30 La artemisinina y muchos de sus derivados son escasamente solubles en agua, lo que puede conducir a problemas de absorción en el cuerpo humano y una absorción retardada. En contraste, ciertos glucósidos de di- y triterpenos, tal como se describen en la presente memoria, son sumamente hidrosolubles, y superan las barreras de absorción y biodisponibilidad mucho más fácilmente. Por ejemplo, tanto Reb A como mogrosídeo V son completamente hidrosolubles, y por lo tanto más útiles y fácilmente disponibles para los tratamientos antimaláricos cuando se

incluyen en las composiciones de la presente invención.

Sin limitarse por la teoría, se cree que ciertos compuestos de diterpenos y/o triterpenos usados en combinación con uno o más compuestos seleccionados de mefloquina, halofantrina, artesunato, arteméter, cloroquina, lumefantrina, primaquina, sulfadoxina, sulfaleno, pirimetamina, doxiciclina, tetraciclina, azitromicina, proguanilo, cicloguanilo, dapsona, artemisinina y atovacuona, lo más preferiblemente artemisinina o sus derivados, proporcionarían un tratamiento eficaz para la malaria, eliminando o inhibiendo así los parásitos de *Plasmodium* presentes en un paciente humano, de una manera sinérgica. Se espera que la TCA con el uso de derivados de glucósidos de diterpenos y/o triterpenos proporcione efectos terapéuticos mayores que cada agente solo, es decir, artemisinina frente al compuesto de terpeno, y también evite la resistencia a fármacos. En una realización alternativa, se espera que la TCA con el uso de artemisinina (o un derivado) y una combinación de diterpeno y triterpeno proporcione efectos terapéuticos mayores que cualquiera de los agentes solos, y también evite la resistencia a fármacos. En otra realización alternativa, se espera además que la TCA con el uso de artemisinina (o un derivado) y una combinación de un extracto de hojas de Stevia que contiene glucósidos de esteviol y un extracto de frutos de Luo Han proporcione efectos terapéuticos mayores que cualquiera de los agentes solos, y también evite la resistencia a fármacos. En otra realización alternativa, se espera además que la TCA con el uso de artemisinina (o un derivado) y una combinación de un extracto de hojas de Stevia que contiene glucósidos de esteviol y mogróside V proporcione efectos terapéuticos mayores que cualquiera de los agentes solos, y también evite la resistencia a fármacos. En otra realización alternativa, se espera además que la TCA con el uso de artemisinina (o un derivado) y una combinación de un rebaudiósido A y mogróside V proporcione efectos terapéuticos mayores que cualquiera de los agentes solos, y también evite la resistencia a fármacos. En otra realización alternativa, se espera además que la TCA con el uso de artemisinina (o un derivado) y una combinación de un rebaudiósido A y un extracto de frutos de Luo Han proporcione efectos terapéuticos mayores que cualquiera de los agentes solos, y también evite la resistencia a fármacos.

Por ejemplo, los compuestos se pueden usar en combinación con un glucósido de diterpeno y/o un glucósido de triterpeno en las realizaciones de la presente invención. Los compuestos adecuados incluyen mefloquina, halofantrina, artesunato, arteméter, arteéter, cloroquina, lumefantrina, primaquina, sulfadoxina, sulfaleno, pirimetamina, doxiciclina, tetraciclina, azitromicina, proguanilo, cicloguanilo, dapsona, artemisinina, dihidroartemisinina y atovacuona, pero preferiblemente artemisinina.

Los métodos descritos anteriormente y las composiciones según la invención se pueden entender mejor con respecto a los Ejemplos siguientes. El extracto de glucósidos de esteviol se puede obtener de EUSTAS (Asociación Europea de la Estevia, Huesca, España), y Pure Circle, Oak Brook, Illinois, EE.UU. Reb A (un extracto de hojas de Stevia) con una pureza de alrededor del 90-95% está disponible como se describió anteriormente y de GLG, Vancouver, Columbia Británica, Canadá. Mogróside V (polvo de extracto puro de frutos de Luo Han) con una pureza de alrededor del 35-60% está disponible de PureLo® de BioVittoria Limited (Hamilton, Nueva Zelanda). El polvo de frutos de Luo Han está disponible también como Fruit-Sweetness™ de BioVittoria Limited (Hamilton, Nueva Zelanda), y Guilin Layn Natural Ingredients Corp., Guilin, Guangxi, R.P. China.

En la presente memoria descriptiva se usan las abreviaturas siguientes. EtOAc: acetato de etilo; DMSO: sulfóxido de dimetilo; RMF: resistente a múltiples fármacos; CQ: cloroquina; PBS: solución salina tamponada con fosfato.

EJEMPLO 1A

Muestra nº 1: Rebaudiósido A (extracto puro de hojas de *Stevia*), pureza >95% en peso

Muestra nº 2: Glucósidos de esteviol (extracto puro de hojas de *Stevia*), pureza de aprox. 95% en peso

Muestra nº 3: Polvo de extracto puro de frutos de Luo Han Guo que contiene Mogróside V (aprox. 40% en peso)

Muestra nº 4: Concentrado de jugo de Luo Han Guo (del fruto de Luo Han fresco)

Muestra nº 5: Extracto de Luo Han Guo (fase acuosa)

Muestra nº 6: Extracto de Luo Han Guo (fase de n-butanol) = "Compuesto B"

Muestra nº 7: Extracto de Luo Han Guo (fase de EtOAc) = "Compuesto A"

Muestra nº 8: Extracto general de Luo Han Guo (del fruto de Luo Han seco)

Como primera etapa, se reconstituyó polvo de frutos de Luo Han (135 mg), es decir, polvo de extracto puro que contiene Mogróside V (aprox. 40% en peso), en agua mediante extracción con agua caliente (3 X 400 mL), y los extractos de agua combinados se repartieron, primero con EtOAc (200 mL, 2 X 100 mL), y a continuación con n-butanol (200 mL, 2 X 100 mL), respectivamente, para producir 3 fracciones que correspondieron a las Muestras 5-7 anteriores, y el disolvente orgánico se eliminó mediante rotavapor para producir el "Compuesto A" (fracción de EtOAc) y el "Compuesto B" (fracción de n-butanol). Se ensayó la actividad antimalárica del Compuesto A y del Compuesto B. La Muestra 5 corresponde a la fase acuosa final después del reparto con EtOAc, seguido de n-

butanol.

Además, el extracto general de Luo Han Guo (Muestra 8) se preparó mediante extracción del fruto de Luo Han seco con agua caliente como en la primera etapa anterior, sin manipulación adicional.

5 Preparación de disoluciones de ingredientes activos. Cada una de las muestras enumeradas anteriormente se disolvió en DMSO para preparar una disolución de reserva de 0,1 mg/μL.

EJEMPLO 1B

10 La cepa resistente a múltiples fármacos (RMF) de *Plasmodium falciparum* 7G8, (obtenida del Malaria Research and Reference Reagent Resource Centre (MR4), Manassas, Virginia, EE.UU.), se cultivó *in vitro* en medio de cultivo celular RPMI 1640 (complementado con un 10% de Suero Humano) con PCV (hematocrito) del 5%. El *P. falciparum* se sincronizó con las células añadiendo un 5% de D-sorbitol, y las células sincronizadas se extendieron después sobre placas de cultivo después de alcanzar la fase de forma anular, con una tasa de infección inicial del 1% y PCV del 5%.

15 Las disoluciones de reserva en DMSO para la Muestra nº 7 ("Compuesto A") y la Muestra nº 6 ("Compuesto B"), como se describieron anteriormente, se diluyeron con medio de cultivo hasta 2000 μg/ml como disolución madre y se diluyeron con medio de cultivo hasta una concentración en gradiente en forma de dilución en serie a un tercio en un ensayo de análisis de actividad (las disoluciones del ingrediente activo deberían ser menores del 10% del sistema de cultivo, y la concentración de DMSO debería ser menor del 0,5% para evitar una influencia adversa sobre el crecimiento de *P. falciparum*). Se extendieron 10 μl disolución de ingrediente activo más 90 μl de medio de cultivo de *P. falciparum* en cada pocillo. El cultivo celular se observó al microscopio para determinar la tasa de infección mediante examen de extensiones con la tinción de Giemsa estándar, tal como se conoce en la técnica.

20 Porcentaje de inhibición = (tasa de infección del control con blanco - tasa de infección del grupo tratado con ingrediente activo o tratado con fármaco) / tasa de infección del control con blanco x 100%.

25 Mediante el uso de un grupo tratado con cloroquina como control positivo, se generó una curva dosis-respuesta como porcentaje del valor de crecimiento frente a la concentración de ingrediente activo/fármaco (función de análisis de regresión no lineal del programa informático Graphpad Prism 3.0, GraphPad Software, La Jolla, California, EE.UU.) para determinar la CI_{50} (concentración inhibitoria media). La Figura 1 muestra las curvas de inhibición del crecimiento dosis-respuesta para cloroquina (CQ) y el Compuesto A.

Tabla 1

Muestra	Actividad antimalárica, CI_{50} (μg/mL)
CQ (Cloroquina)	0,264±0,012
7 (fracción de EtOAc del 40% de polvo de frutos de Luo Han) "Compuesto A"	22,14±1,68
6 (fracción de n-butanol del 40% de polvo de frutos de Luo Han) "Compuesto B"	>200

30 Como se muestra en la Tabla 1, la Muestra nº 7 mostró una actividad intensa contra *P. falciparum* 7G8, con una CI_{50} de 22,14 μg/ml. Como se muestra en la Figura 1, la Muestra nº 7 de extracto de frutos de Luo Han mostró una inhibición completa del crecimiento de células infectadas a las concentraciones superiores ensayadas.

EJEMPLO 1C

35 Cultivo de parásitos. El clon 3D7 sensible a fármacos y el clon Dd2 resistente a múltiples fármacos (RMF) de *Plasmodium falciparum*, obtenidos del Malaria Research and Reference Reagent Resource Centre (MR4), Manassas, Virginia, EE.UU., se mantuvieron continuamente en eritrocitos humanos del grupo sanguíneo O+ y un 10% de suero humano en una mezcla de gases que consistió en un 7% de CO₂, 5% de O₂ y 88% de N₂.

40 Las disoluciones de reserva del Ejemplo 1A, y la CQ empleada como control positivo (preparada en forma de una disolución de reserva 10 mM en PBS), se almacenaron a -20 °C. Cada disolución de trabajo se preparó reciente en medio de cultivo celular. En todos los ensayos, las concentraciones de DMSO y PBS se mantuvieron al 0,5%, lo que no afectó al crecimiento de los cultivos de control.

Ensayos de concentración inhibitoria *in vitro*. Los clones 3D7 y Dd2 de *P. falciparum* se mantuvieron continuamente en eritrocitos humanos del grupo sanguíneo O+ y un 10% de suero humano en una mezcla de gases que consistió en un 7% de CO₂, 5% de O₂, y 88% de N₂, sincronizados mediante tratamientos en serie con un 5% de D-sorbitol. La inhibición del crecimiento *in vitro* de eritrocitos parasitados en etapa anular comenzando a un 1% de parasitemia y

un 2,5% de hematocrito se determinó mediante microscopía óptica de extensiones tratadas con tinción de Giemsa.

Los resultados de los experimentos de control positivos mediante el uso de CQ se presentan en las Figuras 2 y 3.

La Figura 2 muestra el efecto de CQ sobre clones 3D7 de *P. falciparum* en una curva dosis-respuesta como porcentaje de la inhibición del crecimiento frente a la concentración de fármaco.

- 5 La Figura 3 muestra el efecto de CQ sobre clones Dd2 de *P. falciparum* en una curva dosis-respuesta como porcentaje de la inhibición del crecimiento frente a la concentración de fármaco.

A continuación, los extractos del Ejemplo 1A se ensayaron basándose en las disoluciones de reserva discutidas anteriormente. La Tabla 2 siguiente muestra el efecto de los extractos sobre los clones 3D7 y Dd2 de *P. falciparum*.

Tabla 2

Nivel de Tratamiento	Porcentaje de Inhibición (% , Media ± DE)	
	3D7	Dd2
Muestra nº 1 (10 ⁻⁴ g/L)	41,33±0,00	56,14±1,36
Muestra nº 2 (10 ⁻⁴ g/L)	41,87±8,30	57,83±2,39
Muestra nº 3 (10 ⁻⁴ g/L)	12,00±11,31	44,58±3,41
Muestra nº 4 (10 ⁻⁴ g/L)	25,33±7,54	42,17±0,00
Muestra nº 5 (10 ⁻⁴ g/L)	9,33±7,54	50,12±4,43
Muestra nº 6 (10 ⁻⁴ g/L)	4,00±7,54	27,71±6,82
Muestra nº 7 (10 ⁻⁴ g/L)	30,67±7,54	42,17±6,82
Muestra nº 8 (10 ⁻⁴ g/L)	9,33±0,00	32,53±6,82

- 10 Los resultados de la Tabla 2 demuestran claramente que los extractos obtenidos de hoja de Stevia y de fruto de Luo Han pueden inhibir el crecimiento de los clones 3D7 y Dd2 de *P. falciparum*. Además, con referencia a la preparación extractiva del Ejemplo 1A que produjo las Muestras 5-7, los resultados demostraron que los compuestos activos parecen estar en la fase de EtOAc (Muestra 7).

- 15 Es notable que todos los extractos, obtenidos de hoja de Stevia o de fruto de Luo Han, mostraron eficacia en la inhibición del parásito que provoca la malaria. En particular, los extractos, obtenidos de la hoja de Stevia o del fruto de Luo Han, fueron muy eficaces contra la cepa Dd2 resistente a fármacos.

Ejemplo 1D

- 20 El extracto general de Luo Han Guo (Muestra 8) se preparó mediante la extracción del fruto seco de Luo Han con agua caliente como en el Ejemplo 1A, y después se fraccionó con EtOAc y n-butanol, respectivamente, como en el Ejemplo 1A para producir 3 fracciones que correspondieron a las Muestras 5a-7a. Las Muestras 6a-7a también corresponden al "compuesto B" y al "compuesto A", respectivamente.

El *P. falciparum* se sincronizó con las células añadiendo un 5% de D-sorbitol, y las células sincronizadas se extendieron después sobre placas de cultivo después de alcanzar la fase de forma anular, con una tasa de infección inicial del 1% y PCV del 5%.

- 25 Las disoluciones de reserva en DMSO para la Muestra nº 7a ("Compuesto A") y la Muestra nº 6a ("Compuesto B"), como se describieron anteriormente, se diluyeron con medio de cultivo hasta 2000 µg/ml como disolución madre y se diluyeron con medio de cultivo hasta una concentración en gradiente en forma de dilución en serie a un tercio en un ensayo de análisis de actividad (las disoluciones del ingrediente activo deberían ser menores del 10% del sistema de cultivo, y la concentración de DMSO debería ser menor del 0,5% para evitar una influencia adversa sobre el crecimiento de *P. falciparum*). Se extendieron 10 µl disolución de ingrediente activo más 90 µl de medio de cultivo de *P. falciparum* en cada pocillo. El cultivo celular se observó al microscopio para determinar la tasa de infección mediante un examen de extensiones con la tinción de Giemsa estándar.

Porcentaje de inhibición = (tasa de infección del control con blanco - tasa de infección del grupo tratado con ingrediente activo o tratado con fármaco) / tasa de infección del control con blanco x 100%.

- 35 Mediante el uso de un grupo tratado con cloroquina y Artemisinina como control positivo, se generó una curva dosis-respuesta como porcentaje del valor de crecimiento frente a la concentración de ingrediente activo/fármaco (función de análisis de regresión no lineal del programa informático Graphpad Prism 3.0, GraphPad Software, La Jolla, California, EE.UU.) para determinar la CI₅₀ (concentración inhibitoria media). Véase la Tabla 3 más adelante.

El clon 3D7 sensible a fármacos (SF) y el clon Dd2 resistente a múltiples fármacos (RMF) de *Plasmodium falciparum*, obtenidos del Malaria Research and Reference Reagent Resource Centre (MR4), Manassas, Virginia, EE.UU., se mantuvieron continuamente en eritrocitos humanos del grupo sanguíneo O+ y un 10% de suero humano en una mezcla de gases que consistió en un 7% de CO₂, 5% de O₂ y 88% de N₂.

- 5 En todos los ensayos, las concentraciones de DMSO y PBS se mantuvieron al 0,5%, lo que no afectó al crecimiento de los cultivos de control. Ensayos de concentración inhibitoria *in vitro*. Los clones 3D7 y Dd2 de *P. falciparum* se mantuvieron continuamente en eritrocitos humanos del grupo sanguíneo O+ y un 10% de suero humano en una mezcla de gases que consistió en un 7% de CO₂, 5% de O₂, y 88% de N₂, sincronizados mediante tratamientos en serie con un 5% de D-sorbitol. La inhibición del crecimiento *in vitro* de eritrocitos parasitados en etapa anular comenzando a un 1% de parasitemia y un 2,5% de hematocrito se determinó mediante microscopía óptica de extensiones tratadas con tinción de Giemsa.

Tabla 3

Muestra	(CI ₅₀ , med. nM)	
	3D7 (SF)	Dd2 (RMF)
1	219,56±10,15	376,18±12,39
2	231,87±18,19	398,85±22,31
3	222,98±11,38	349,15±13,76
4	528,76±27,19	848,35±40,67
5a	>1000	>1000
6a "Compuesto B"	>1000	>1000
7a "Compuesto A"	90,89±7,32	232,17±16,76
8	457,32±35,65	556,35±49,98
CQ (Cloroquina)	1,37±0,12	22,59±0,82
Coartem	0,09±0,00	0,13±0,02

- 15 Como se muestra en la Tabla 3, la Muestra nº 7a contuvo la actividad antimalárica tras la extracción. También se descubrió que Rebaudiósido A (Muestra 1) y Mogrósido V (Muestra 3) mostraron en general actividades comparables contra los parásitos ensayados.

Ejemplo 2

- 20 Ensayo de tablero. Se determinó la actividad antimalárica de los extractos de frutos de Luo Han y de los extractos de hojas de *Stevia in vitro* y se predijo mediante el uso de la cepa malárica DD2 de *P. falciparum*. Las muestras se mezclan en diluciones en serie 1:2 y se calcula el índice CIF (ICIF). (Rand, K. H., Houck, H. J., Brown, P. et al. "Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy", *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* (1993) 37:613-5; Eliopoulos, G.M., Moellering R.C. en *Antibiotics in Laboratory Medicine*, ed. Lorian V (Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1991), págs. 432-492; Ghannoum, M.A., Fu, Y., Ibrahim, A.S., Mortara, L.A., Shafiq, M.C., Edwards, J.E., Jr., Criddle, R.S. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1995) 39:2459-2465; Barchiesi, F., DiFrancesco, L.F., Scalise, G. "*In Vitro* Activities of Terbinafine in Combination With Fluconazole and Itraconazole Against Isolates of *Candida albicans* With Reduced Susceptibility to Azoles", *Antimicrob. Agents Chemother.* (1997) 41:1812-1814.)

- 30 Para determinar si la lectura de la terapia de combinación es aditiva, sinérgica, o indiferente, se calculó el índice de CIF (ICIF) mediante el uso del ensayo de tablero. El ICIF representa la suma de los CIFs de cada fármaco ensayado, en los que se determina la CIF (concentración inhibitoria fraccional) para cada fármaco dividiendo la CIM de cada fármaco cuando se usa en combinación entre la CIM de cada fármaco cuando se usa solo. ICIF = (CIMfármaco A en combinación/CIMfármaco A solo) + (CIMfármaco B en combinación/CIMfármaco B solo). Las suposiciones previas son que (i) el ensayo usa concentraciones separadas por un factor de 2, y (ii) los cambios de CIM en una etapa de dilución están dentro del intervalo de error experimental. También se han usado otros métodos sofisticados; por ejemplo, se usó una metodología de gráfica de contorno-superficie para caracterizar la naturaleza de tres agentes antifúngicos en combinaciones con el uso de diversas concentraciones de cada agente.

35 El ICIF muestra sinergia a un valor de $\leq 0,5$, mientras los valores hallados en el intervalo de 0,5 a alrededor de 1,0 muestran un efecto aditivo, no sinérgico.

Ejemplo 2A

Combinación de extracto de hojas de *Stevia* que contiene glucósidos de esteviol y extracto de frutos de Luo Han.

Una combinación de extracto de frutos de Luo Han (Compuesto A) como se describió anteriormente y un extracto de hojas de Stevia que contenía glucósidos de esteviol (como en el Ejemplo 1A, Muestra 2) proporcionó un ICIF de 0,3, lo que demuestra una capacidad sinérgica para inhibir el crecimiento de *P. falciparum in vitro* en un grado mayor que cada componente solo. (CIM del compuesto A solo: 232 nM; CIM de glucósidos de esteviol solos: 400 nM; CIM del compuesto A en combinación: 14,5 nM; CIM de glucósidos de esteviol en combinación: 100 nM).

Ejemplo 2B

Combinación de extractos de hojas de Stevia que contienen glucósidos de esteviol y mogrósido V. De acuerdo con una realización, se espera que una combinación 1:1 p/p de un extracto de hojas de Stevia que contiene glucósidos de esteviol (como en el Ejemplo 1A, Muestra 2) y un polvo de extracto puro de frutos de Luo Han que contiene Mogrósido V (40%) (como en el Ejemplo 1A, Muestra 3) pueda inhibir el crecimiento de *P. falciparum in vitro e in vivo* en un grado mayor que cada componente solo.

Ejemplo 2C

Combinación de rebaudiósido A (Reb A) y mogrósido V. De acuerdo con una realización, se espera que una combinación 1:1 p/p de una combinación de Reb A (como en el Ejemplo 1A, Muestra 1) y un polvo de extracto puro de frutos de Luo Han que contiene Mogrósido V (40%) (como en el Ejemplo 1A, Muestra 3) pueda inhibir el crecimiento de *P. falciparum in vitro e in vivo* en un grado mayor que cada componente solo.

Ejemplo 2D

Combinación de rebaudiósido A (Reb A) y un extracto de frutos de Luo Han. Una combinación de Reb A (como en el Ejemplo 1A, Muestra 1) y un extracto de frutos de Luo Han (Compuesto A) proporcionó un ICIF de 0,3, lo que demuestra una capacidad sinérgica para inhibir el crecimiento de *P. falciparum in vitro* en un grado mayor que cada componente solo. (CIM del compuesto A solo: 232 nM; CIM de Reb A solo: 376 nM; CIM del compuesto A en combinación: 14,5 nM; CIM de Reb A en combinación: 94 nM).

Ejemplo 2E (Control)

Combinación de rebaudiósido A (Reb A) y Artemisinina. Una combinación de Reb A (como en el Ejemplo 1A, Muestra 1) y artemisinina proporcionó un ICIF de alrededor de 0,9-1,0, lo que demuestra un efecto aditivo solamente. (CIM de artemisinina sola: 0,13 nM; CIM de Reb A solo: 376 nM; CIM de artemisinina en combinación: 0,0081 nM; CIM de Reb A en combinación: 376 nM).

Ejemplo 3A

Una composición que incluye rebaudiósido A (Reb A). De acuerdo con una realización, un paciente (o cada miembro de una cohorte de pacientes) se trata de manera oral con una o más dosis de una composición acuosa que incluye una dosis diaria total de hasta alrededor de 500 mg de rebaudiósido A. Se espera que la infección por *P. falciparum* se reduzca o inhiba en 3-7 días tal como se determina mediante monitorización estándar de películas de sangre.

Ejemplo 3B

Combinación de rebaudiósido A (Reb A) y un extracto de frutos de Luo Han que contiene mogrósido V. De acuerdo con una realización, un paciente (o cada miembro de una cohorte de pacientes) se trata de manera oral con una o más dosis de una composición acuosa que incluye una dosis diaria total de hasta alrededor de 500 mg de rebaudiósido A y hasta alrededor de 500 mg de mogrósido V. Se espera que la infección por *P. falciparum* se reduzca o inhiba en 3-7 días tal como se determina mediante monitorización estándar de películas de sangre.

Ejemplo 4

La actividad antimalárica *in vitro* también se confirmó mediante un método de fluorescencia basado en SYBR Green I para malaria descrito previamente por Smilkstein et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, mayo de 2004, pág. 1803-1806, Vol. 48, nº 5, con ligeras modificaciones. Las disoluciones de fármacos se diluyeron en serie con medio de cultivo y se distribuyeron en cultivos de parásitos asíncronos en placas de 96 pocillos por cuadruplicado para conseguir un 0,2% de parasitemia con un 2% de hematocrito en un volumen total de 100 µL. Las placas se incubaron después durante 72 h a 37 °C. Tras la incubación, se añadieron 100 µL de tampón de lisis con 0,2 µL/mL de SYBR Green I a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 h en la oscuridad y después se colocaron en un lector de placas de fluorescencia de 96 pocillos (Multilabel HTS Counter; PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) con longitudes de onda de excitación y emisión a 497 nm y 520 nm, respectivamente, para la medida de la fluorescencia. La concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) se determinó mediante análisis de regresión no lineal de curvas logísticas dosis-respuesta mediante el uso del programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Este ejemplo sirve como método comparativo.

A continuación, se llevó a cabo la parte de ensayo del procedimiento del Ejemplo 1C mediante el uso de Coartem como control positivo. Coartem es una terapia de combinación basada en artemisinina (TCA) de dosis fija disponible de Novartis AG, Basilea, Suiza. Cada comprimido de Coartem contiene 20 mg de arteméter y 120 mg de

5 lumefantrina. Arteméter tiene un inicio rápido de la acción, y se elimina rápidamente, mientras lumefantrina se elimina más lentamente. Por lo tanto, la combinación elimina rápidamente los parásitos, a la vez que además previene la reaparición de parásitos en la sangre. El fármaco se ha usado de manera generalizada en China para sustituir a la cloroquina (CQ) para el tratamiento y la profilaxis de la malaria. La Tabla 4 muestra el efecto de los tratamientos con fármacos estándar sobre los clones 3D7 y Dd2 de *P. falciparum* tal como se determina mediante el método de fluorescencia. Se cree que los compuestos activos hallados en los ejemplos previos también proporcionarían una inhibición significativa, si no comparable, del crecimiento de células parásitas.

Tabla 4

Tratamiento	Susceptibilidad <i>in vitro</i> (CI ₅₀ , nM)	
	3D7	Dd2
CQ	1,63±0,10	22,14±1,96
Coartem	0,07±0,09	0,09±0,05

Las CI₅₀s se presentan como medias ± errores estándar de las medias (n>3).

10 Las composiciones de la presente invención se pueden administrar en combinación con un vehículo aceptable. Los ingredientes activos en tales formulaciones pueden comprender del 1% en peso al 99% en peso, o, de manera alternativa, del 0,1% en peso al 99,9% en peso. Un "vehículo aceptable" significa cualquier vehículo, diluyente o excipiente que sea compatible con los otros ingredientes de la formulación y que no sea perjudicial para el usuario. Los excipientes útiles incluyen celulosa microcristalina, estearato magnésico, estearato cálcico, o cualquier carbohidrato aceptable (p.ej., manitol, xilitol).

15 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ingredientes activos en tales formulaciones pueden comprender del 1% en peso al 99% en peso, o, de manera alternativa, del 0,1% en peso al 99,9% en peso. "Vehículo farmacéuticamente aceptable" significa cualquier vehículo, diluyente o excipiente que sea compatible con los otros ingredientes de la formulación y que no sea perjudicial para el usuario.

20 Las composiciones antimaláricas de la presente invención y los compuestos potentes derivados del fruto de Luo Han y/o de la hoja de Stevia se pueden administrar en combinación con un vehículo aceptable. Los ingredientes activos en tales formulaciones pueden comprender del 1% en peso al 99% en peso, o, de manera alternativa, del 0,1% en peso al 99,9% en peso. Un "vehículo aceptable" significa cualquier vehículo, diluyente o excipiente que sea compatible con los otros ingredientes de la formulación y que no sea perjudicial para el usuario.

25 Sistema de administración

Las formas farmacéuticas adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, soluciones, suspensiones, polvos, gomas, y dulces. Los sistemas de administración sublingual incluyen, pero sin limitación, tabletas disolubles bajo y sobre la lengua, gotas líquidas, y bebidas. Se pueden usar películas comestibles, polímeros hidrófilos, películas disolubles orales o tiras disolubles orales. Otros sistemas de administración útiles comprenden nebulizadores o inhaladores orales o nasales, y similares.

30 Para administración oral, los compuestos activos se pueden combinar con uno o más ingredientes inactivos sólidos para la preparación de comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos u otras formas farmacéuticas adecuadas. Por ejemplo, el agente activo se puede combinar con al menos un excipiente tal como rellenos, aglutinantes, humectantes, agentes disgregantes, retardantes de la disolución, aceleradores de la absorción, agentes humectantes, absorbentes, o agentes lubricantes. Otros excipientes útiles incluyen estearato magnésico, estearato cálcico, manitol, xilitol, edulcorantes, almidón, carboximetilcelulosa, celulosa microcristalina, sílice, gelatina, dióxido de silicio, y similares.

Vías de Administración

40 Los compuestos activos se pueden administrar mediante cualquier vía, que incluye, pero sin limitación, la administración oral, sublingual, bucal, ocular, pulmonar, rectal, y parenteral, o en forma de un nebulizador oral o nasal (p.ej., inhalación de vapores nebulizados, gotículas, o partículas sólidas). La administración parenteral incluye, por ejemplo, la administración intravenosa, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, intranasal, intravaginal, intravesical (p.ej., en la vejiga), intradérmica, transdérmica, tópica, o subcutánea. Por ejemplo, el ingrediente activo se puede localizar en un depósito para la liberación controlada a la circulación.

45 El tratamiento se puede llevar a cabo durante un periodo tan largo como sea necesario, en una única sesión ininterrumpida, o en sesiones distintas. El médico que aplique el tratamiento sabrá cómo incrementar, disminuir, o interrumpir el tratamiento basándose en la respuesta del paciente. Según una realización, el tratamiento se lleva a cabo durante alrededor de un día a alrededor de siete días. El calendario de tratamiento se puede repetir según sea necesario.

5 En conclusión, se ha demostrado que tanto Reb A purificado como los extractos en bruto de hojas de Stevia son muy eficaces contra las cepas resistentes a fármacos conocidas del parásito que provoca la malaria. También se ha demostrado que los extractos tanto purificados como en bruto del fruto de Luo Han guo son muy eficaces contra las cepas resistentes a fármacos conocidas del parásito que provoca la malaria. Se espera además que las combinaciones de Reb A y del extracto de frutos de Luo Han sean sumamente eficaces contra las cepas resistentes a fármacos conocidas del parásito que provoca la malaria.

Se debería hacer referencia a las reivindicaciones adjuntas, más que a la memoria descriptiva anterior, como indicativas del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un extracto de hojas de Stevia que contiene glucósidos de esteviol y un vehículo aceptable para el uso en el tratamiento de una infección malárica.
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un extracto de frutos de Luo Han.
- 5 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, que comprende además un compuesto seleccionado del grupo que consiste en artemisinina, arteméter, arteéter, artesunato, dihidroartemisinina, mefloquina, halofantrina, cloroquina, lumefantrina, primaquina, sulfadoxina, sulfaleno, pirimetamina, doxiciclina, tetraciclina, azitromicina, proguanilo, cicloguanilo, dapsona, y atovacuona.
- 10 4. La composición de la reivindicación 1, en la que el extracto de hojas de Stevia contiene uno o más glucósidos de diterpenos o triterpenos seleccionados del grupo que consiste en rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, dulcósido B, rubusósido, esteviósido, esteviolbiósido, siamenósido I, grosmomósido I, y combinaciones de los mismos.
- 15 5. La composición de la reivindicación 2, en la que el extracto de frutos de Luo Han contiene uno o más glucósidos de diterpenos o triterpenos seleccionados del grupo que consiste en mogrósido II, mogrósido III, mogrósido IV, mogrósido V, y las combinaciones de los mismos.
6. La composición de la reivindicación 4, en la que el o los glucósidos de diterpenos son rebaudiósido A.
7. La composición de la reivindicación 6, en la que la cantidad eficaz de rebaudiósido A para una dosis total está en un intervalo de 10 mg a 500 mg.
8. La composición de la reivindicación 5, en la que el o los glucósidos de triterpenos son mogrósido V.
- 20 9. La composición de la reivindicación 8, en la que la cantidad eficaz de mogrósido V para una dosis total está en un intervalo de 10 mg a 500 mg.
10. La composición de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la infección malárica es resistente a fármacos.
11. La composición de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la vía de administración de la composición se selecciona del grupo que consiste en oral, sublingual, bucal, intranasal, parenteral, intravenosa, intradérmica, transdérmica, intramuscular, por supositorios, y subcutánea.
- 25 12. Una composición que comprende un extracto de hojas de Stevia que contiene glucósidos de esteviol, un extracto de frutos de Luo Han que contiene glucósidos de triterpenos, y un vehículo aceptable para el uso en medicina.
- 30 13. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de rebaudiósido A, una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto de frutos de Luo Han, y un vehículo aceptable, en la que el rebaudiósido A está presente en un intervalo del 1% al 99% en peso de la composición total, y el extracto de frutos de Luo Han está presente en un intervalo del 1% al 99% en peso de la composición total, y en la que la composición comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en mefloquina, halofantrina, artesunato, arteméter, arteéter, cloroquina, lumefantrina, primaquina, sulfadoxina, sulfaleno, pirimetamina, doxiciclina, tetraciclina, azitromicina, proguanilo, cicloguanilo, dapsona, artemisinina, dihidroartemisinina, atovacuona, y combinaciones de los mismos.
- 35 14. La composición de la reivindicación 13, en la que el compuesto es artemisinina y el vehículo aceptable es un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 15. La composición de las reivindicaciones 13 a 14 formulada para administración oral, parenteral, intravenosa, intramuscular, intranasal, intradérmica, transdérmica, bucal, subcutánea, o por supositorios.