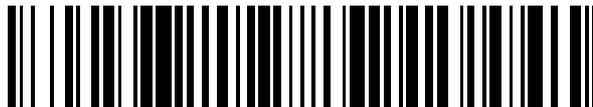


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 033**

51 Int. Cl.:

**A61P 33/00** (2006.01)

**A61K 8/00** (2006.01)

**A61K 31/05** (2006.01)

**A61K 31/085** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2007 PCT/US2007/072292**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2008 WO08003007**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2007 E 07799111 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2043620**

54 Título: **Composiciones para uso en el tratamiento de una infección parasitaria en un sujeto mamífero**

30 Prioridad:

**27.06.2006 US 805963 P**

**10.08.2006 US 822067 P**

**09.11.2006 US 865109 P**

**27.02.2007 US 891813 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.07.2017**

73 Titular/es:

**TYRATECH, INC. (100.0%)**

**1901 SOUTH HARBOR CITY BOULEVARD, SUITE 400**

**MELBOURNE, FL 32901, US**

72 Inventor/es:

**ENAN, ESSAM**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 627 033 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 para uso en el tratamiento de una infección parasitaria en un sujeto mamífero

### 5 SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad de las solicitudes provisionales de Estados Unidos con números de serie 60/8 05.963 presentada el 27 de junio de 2006; 60/822.067 presentada el 10 de agosto de 2006; 60/865.109 presentada el 9 de noviembre de 2006; y 60/891.813 presentada el 27 de febrero de 2007.

10

### CAMPO TÉCNICO

El objeto divulgado en el presente documento se refiere al uso de composiciones para tratar infecciones parasitarias en un sujeto mamífero.

15

### INTRODUCCIÓN Y CONSIDERACIONES GENERALES

Las infecciones parasitarias de plantas, seres humanos y otros animales plantean un problema en todo el mundo. Por ejemplo, más de 650 millones de personas están en riesgo de infección parasitaria gastrointestinal, y aproximadamente 200 millones están realmente infectados. Diversas condiciones contribuyen al desarrollo y la propagación de las infecciones parasitarias, incluyendo: malas condiciones sanitarias; baja resistencia del huésped; expansión de la población; inadecuado control de vectores y reservorios de infección; aumento de la migración de los vectores; y aumento de la migración de los huéspedes, por ejemplo, viajes por todo el mundo debido a operaciones militares o turismo.

25

Dichas infecciones parasitarias presentan gran cantidad de problemas médicos y sociales. Por ejemplo, la infección en un huésped puede socavar el desarrollo del niño, los logros educativos, la salud reproductiva y el desarrollo social y económico. De hecho, algunas infecciones parasitarias pueden causar morbilidad y mortalidad. A pesar de los graves efectos que pueden tener las infecciones parasitarias, hay relativamente pocas opciones de tratamiento disponibles.

30

Los tratamientos disponibles para las infecciones parasitarias son limitados, y los tratamientos para algunas infecciones parasitarias son inexistentes. En la década de 1960, se identificó la niclosamida (también conocida como Yomesan) para uso en el tratamiento de ciertas infecciones parasitarias helmínticas; Sin embargo, la niclosamida presenta ciertos inconvenientes. Por ejemplo, en muchos casos una dosis única de la niclosamida no proporciona un efecto curativo, más bien, sobreviene una recaída debido a que el compuesto tiene dificultades para acceder a cisticercoides enterrados profundamente dentro de las vellosidades mucosales. Por lo tanto, los resultados satisfactorios requieren un tratamiento prolongado con niclosamida durante aproximadamente 7 días. Véase por ejemplo, Davis, Drug treatment of intestinal helminthiasis, Organización Mundial de la Salud (OMS), Ginebra, 1973.

35

Otro fármaco que se ha usado para tratar las infecciones parasitarias helmínticas es Praziquantel (2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino(2,1-a)isoquinofin-4-ona; también conocido como Biltracide). Véase Pearson y Gurrant, Praziquantel: a major advance in anthelmintic therapy. Annals of Internal Medicine, 99: 195-198, 1983. El praziquantel se puede administrar en una dosis única; sin embargo, las estrategias de tratamiento que usan praziquantel están en riesgo debido a la posibilidad de desarrollo de resistencia a praziquantel.

40

Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad en la técnica de composiciones no perjudiciales que sean eficaces para tratar infecciones parasitarias.

45

### RESUMEN

El objeto divulgado en el presente documento satisface algunas o todas de las necesidades identificadas anteriormente, como se volverá evidente para los expertos en la materia después de un estudio de información proporcionada en este documento.

50

Este resumen describe varias realizaciones del objeto divulgado en el presente documento, y en muchos casos enumera variaciones y permutaciones de estas realizaciones.

60 El objeto divulgado en el presente documento incluye composiciones para uso en el tratamiento de infecciones

parasitarias en un sujeto mamífero.

La composición para uso en el tratamiento de una infección parasitaria en un sujeto mamífero incluye para-cimeno, linalol, alfa-pineno, timol y aceite de soja en concentraciones tal como se especifica en la reivindicación 1.

5

La composición para uso en el tratamiento de una infección parasitaria en un sujeto mamífero incluye para-cimeno, linalol, alfa-pineno, timol y aceite de soja.

10 La composición incluye el 25-35 % en peso de para-cimeno, el 1-10 % en peso de linalol, el 1-10 % en peso de alfa-pineno, el 35-45 % en peso de timol y el 20-30 % en peso de aceite de soja. En algunas realizaciones, la composición incluye el 28,39 % en peso de para-cimeno, el 6,6 % en peso de linalol, el 3,8 % en peso de alfa-pineno, el 37,2 % en peso de timol y el 24 % en peso de aceite de soja.

15 La composición incluye el 25-35 % en volumen de para-cimeno, el 1-10 % en volumen de linalol, el 1-10 % en volumen de alfa-pineno, el 35-45 % en volumen de timol y el 20-30 % en volumen de aceite de soja. En algunas realizaciones, la composición incluye el 30 % en volumen de para-cimeno, el 7 % en volumen de linalol, el 4 % en volumen de alfa-pineno, el 35 % en volumen de timol y el 24 % en volumen de aceite de soja.

20 Se describe una composición que incluye tres o más compuestos seleccionados de entre: trans-anetol, para-cimeno, linalol, alfa-pineno y timol. La composición incluye cuatro o más compuestos seleccionados de entre: trans-anetol, para-cimeno, linalol, alfa-pineno y timol. En algunas realizaciones, la composición incluye trans-anetol, para-cimeno, linalol, alfa-pineno y timol.

25 Se describe una composición que incluye el 15-25 % en peso de trans-anetol, el 30-40 % en peso de para-cimeno, el 1-10 % en peso de linalol, el 1-10 % en peso de alfa-pineno y el 35-45 % en peso de timol. La composición incluye el 18,2 % en peso de trans-anetol, el 34,4 % en peso de para-cimeno, el 4,7 % en peso de linalol, el 1,9 % en peso de alfa-pineno y el 40,8 % en peso de timol.

30 Se describe una composición que incluye el 10-20 % en volumen de trans-anetol, el 30-40 % en volumen de para-cimeno, el 1-10 % en volumen de linalol, el 1-10 % en volumen de alfa-pineno y el 35-45 % en volumen de timol. La composición incluye el 17 % en volumen de trans-anetol, el 37 % en volumen de para-cimeno, el 5 % en volumen de linalol, el 2 % en volumen de alfa-pineno y el 39 % en volumen de timol.

35 Se describe una composición que incluye el 15-25 % en peso de trans-anetol, el 1-10 % en peso de para-cimeno, el 35-45 % en peso de linalol, el 1-10 % en peso de alfa-pineno y el 30-40 % en peso de timol. La composición incluye el 18,2 % en peso de trans-anetol, el 1,9 % en peso de para-cimeno, el 40,8 % en peso de linalol, el 4,7 % en peso de alfa-pineno y el 34,4 % en peso de timol.

40 Se describe una composición que incluye el 15-25 % en volumen de trans-anetol, el 1-10 % en volumen de para-cimeno, el 35-45 % en volumen de linalol, el 1-10 % en volumen de alfa-pineno y el 30-40 % en volumen de timol. La composición incluye el 17 % en volumen de trans-anetol, el 2 % en volumen de para-cimeno, el 39 % en volumen de linalol, el 5 % en volumen de alfa-pineno y el 37 % en volumen de timol.

45 En algunas realizaciones, los compuestos de la composición juntos demuestran un efecto anti-parasitario sinérgico. En algunas realizaciones, el efecto porcentual real de la composición es mayor que el efecto porcentual esperado de la composición. En algunas realizaciones, hay un coeficiente de sinergia con respecto a un componente de la composición que es mayor que 5, 10, 25, 50, 75 o 100.

50 En algunas realizaciones, la infección parasitaria es por un parásito protozoo. En algunas realizaciones, el parásito se selecciona de entre protozoos intestinales, protozoos tisulares y protozoos sanguíneos. En algunas realizaciones, el parásito se selecciona de entre: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Trypanosomatida gambiense*, *Trypanosomatida rhodesiense*, *Trypanosomatida cruzi*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium falciparum*, *Trichomonas vaginalis* e *Histomonas meleagridis*.

60 En algunas realizaciones, la infección parasitaria es por un parásito helminto. En algunas realizaciones, el parásito se selecciona de entre nematodos. En algunas realizaciones, el parásito se selecciona de entre Adenophorea. En algunas realizaciones, el parásito se selecciona de entre Secementea. En algunas realizaciones, el parásito se selecciona de entre: *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Ancylostoma duodenale*,

*Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis*, *Wuchereria bancrofti*, *Dracunculus medinensis*. En algunas realizaciones, el parásito se selecciona de entre trematodos. En algunas realizaciones, el parásito se selecciona de entre: duelas sanguíneas, duelas hepáticas, duelas intestinales y duelas pulmonares. En algunas realizaciones, el parásito se selecciona de entre: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*,  
5 *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Heterophyes heterophyes*, *Paragonimus westermani*.

En algunas realizaciones, el parásito se selecciona de entre cestodos. En algunas realizaciones, el parásito se selecciona de entre *Taenia sodium*, *Taenia saginata*, *Hymenodepis nana*, *Echinococcus granulosus*.

10 En algunas realizaciones, la composición se proporciona en una formulación. La formulación puede incluir la composición y un vehículo, tal como un producto alimentario. En algunas realizaciones, la formulación incluye la composición encapsulada o microencapsulada con un material de envuelta externa.

El objeto divulgado en el presente documento incluye el uso de una composición para tratar una infección parasitaria  
15 en un sujeto mamífero. En el presente documento se describen procedimientos de administración al sujeto mamífero de una cantidad efectiva de una composición.

Se describe un procedimiento para seleccionar una composición para uso en el tratamiento de una infección parasitaria. El procedimiento incluye: proporcionar una célula que expresa un receptor de tiramina; poner en  
20 contacto los compuestos de ensayo con la célula; medir la afinidad de unión al receptor de los compuestos; medir al menos un parámetro seleccionado de entre, (i) nivel de AMPc intracelular, y (ii) nivel de Ca<sup>2+</sup> intracelular; identificar un primer compuesto para la composición que es capaz de alterar al menos uno de dichos parámetros, y que tiene una elevada afinidad de unión al receptor por el receptor de tiramina; identificar un segundo compuesto para la  
25 composición que es capaz de alterar al menos uno de dichos parámetros, y que tiene una baja afinidad de unión al receptor por el receptor de tiramina; y seleccionar una composición que incluye los primer y segundo compuestos. La composición seleccionada demuestra un efecto anti-parasitario que supera el efecto anti-parasitario de cualquiera de los compuestos cuando se usan solos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 La figura 1 es un gráfico de barras que demuestra las tasas de curación de animales infectados por *H. nana* y tratados con compuestos divulgados en el presente documento.

La figura 2 es una serie de gráficos lineales que demuestran la destrucción eficaz de *S. mansoni in vitro* mediante diferentes concentraciones de compuestos divulgados en el presente documento. TL100 = tiempo letal requerido  
35 para inducir un 100 % de mortalidad entre gusanos tratados. ppm = mg (peso) en 1 l (volumen). Por ejemplo 100 ppm igualan a 100 mg (peso) en 1 l (volumen) de solución salina.

La figura 3 es un gráfico de barras que demuestra la destrucción eficaz de *S. mansoni in vitro* mediante una concentración de 100 ppm de compuestos divulgados en el presente documento, solos o en combinación entre sí. TL100 = tiempo letal requerido para inducir un 100 % de mortalidad entre gusanos tratados.

40 La figura 4 es una serie de gráficos lineales que demuestran la destrucción eficaz de *H. meleagridis in vitro* mediante diferentes concentraciones de compuestos divulgados en el presente documento.

La figura 5 es una serie de gráficos lineales que demuestran la destrucción eficaz de *H. meleagridis in vitro* mediante diferentes concentraciones de compuestos divulgados en el presente documento.

#### 45 DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES EJEMPLARES

Los detalles de una o más realizaciones del objeto divulgado en el presente documento se describen en este documento.

50 El objeto divulgado en el presente documento incluye el uso de composiciones para tratar infecciones parasitarias en un sujeto mamífero.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "infección parasitaria" se refiere a la infección de un huésped vegetal o animal por un parásito, tal como una invasión con éxito de un huésped por un endoparásito,  
55 incluyendo por ejemplo un parásito protozoo o un parásito helminto.

Tal como se usa en el presente documento, el término "parásito" incluye parásitos, tales como aunque sin limitarse a, protozoos, incluyendo protozoos intestinales, protozoos tisulares y protozoos sanguíneos. Los ejemplos de protozoos intestinales incluyen, aunque no se limitan a: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium*  
60 *muris*. Los ejemplos de protozoos tisulares incluyen, aunque no se limitan a: *Trypanosomatida gambiense*,

*Trypanosomatida rhodesiense*, *Trypanosomatida cruzi*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* y *Trichomonas vaginalis*. Los ejemplos de protozoos sanguíneos incluyen, aunque no se limitan a *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium falciparum*. *Histomonas meleagridis* es otro ejemplo más de un parásito protozoo.

5

Tal como se usa en el presente documento, el término "parásito" incluye además, aunque no se limita a: helmintos o gusanos parásitos, incluyendo nematodos (gusanos redondos) y platelmintos (gusanos planos). Los ejemplos de nematodos incluyen, aunque no se limitan a: nematodos de animales y plantas de la clase adenophorea, tales como el nematodo intestinal *Trichuris trichiura* (tricocéfalos) y el nematodo de plantas *Trichodorus obtusus* (nematodo de las raíces cortas); nematodos intestinales de la clase secementea, tales como *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* (oxiuro), *Ancylostoma duodenale* (anquilostoma), *Necator americanus* (anquilostoma) y *Strongyloides stercoralis*; y nematodos tisulares de la clase secementea, tales como *Wuchereria bancrofti* (Filaria bancrofti) y *Dracunculus medinensis* (gusano de Guinea). Los ejemplos de platelmintos incluyen, aunque no se limitan a: Trematodos (duelas), incluyendo duelas sanguíneas, tales como *Schistosoma mansoni* (esquistosomiasis intestinal), *Schistosoma haematobium* y *Schistosoma japonicum*; duelas hepáticas, tales como *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*; duelas intestinales, tales como *Heterophyes heterophyes*; y duelas pulmonares tales como *Paragonimus westermani*. Los ejemplos de platelmintos incluyen, aunque no se limitan a: Cestodos (tenias), incluyendo *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana* y *Echinococcus granulosus*.

20 Las composiciones del objeto divulgado en el presente documento pueden usarse para tratar infecciones parasitarias en un sujeto mamífero. La presente invención se refiere a una composición para uso en el tratamiento o la prevención de una infección parasitaria en un sujeto mamífero, comprende para-cimeno, linalol, alfa-pineno, timol y aceite de soja, donde la concentración de para-cimeno está entre el 25 y el 35 %, la concentración de linalol está entre el 1 y el 10 %, la concentración de alfa-pineno está entre el 1 y el 10 %, la concentración de timol está entre el 25 y el 45 %, y la concentración de aceite de soja está entre el 20 y el 30 % en peso, donde la composición demuestra un efecto anti-parasitario que supera el de cualquiera de sus componentes. En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir compuestos que se consideran en general seguros (compuestos GRAS). En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir compuestos de origen vegetal, tales como aceites esenciales vegetales o monoterpénidos de aceites esenciales vegetales. En algunas realizaciones, las composiciones incluyen dos o más compuestos. En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir cualquiera de los siguientes aceites, o mezclas de los mismos:

t-anetol	aceite de maíz	aceite de flor de lila (LFO)	piperonal
sulfuro de alilo	$\beta$ -costol	aceite de lima	piperonilo
trisulfuro de alilo	criptona	d-limoneno	acetato de piperonilo
disulfuro de alilo	aceite de comino	linalol	alcohol piperonílico
alcohol de artemisia	curzerenona	acetato de linalilo	piperonil amina
acetato	p-cimeno	antranilato de linalilo	prenal
benzaldehído	davanona	lindestreno	pulegona
ácido benzoico	tetrasulfuro de dialilo	lindenol	quinina
acetato de bencilo	ftalato de dietilo	aceite de linaza	aceite de romero
alcohol bencílico	dihidropirocurcero	metil-alil-trisulfuro	sabineno
bergamoteno	ona	mentol	acetato de sabinilo
$\beta$ -bisaboleno	dihidrotagentona	mentona	aceite de cártamo
óxido de bisaboleno	beta-elemento	2-metoxi	$\alpha$ -santaleno
$\alpha$ -bisabolol	gamma-elemento	furanodieno	santalol
óxido de bisabolol	Elmol	acetato de mentilo	sativen
óxido $\beta$ de bisabolol	Estragol	cinnamato de metilo	$\delta$ -selineno
acetato de bornilo	2-etil-2-hexen-1-ol	citrate de metilo	aceite de sésamo
$\beta$ -bourboneno	eugenol	dihidrojasmonato de metilo	$\beta$ -sesquifelandreno
aceite de comino negro (BSO)	acetato de eugenol		fluido de silicona
$\alpha$ -cadinol	$\alpha$ -farneseno	salicilato de mentilo	lauril sulfato sódico
canfeno	(Z,E)- $\alpha$ -farneseno	aceite mineral	aceite de soja
$\alpha$ -canfoleno	E- $\beta$ -farneseno	almizcle ambreta	espatulenol
$\alpha$ -canfoleno aldehído	fenchona	mirceno	tagetona
alcanfor	furanodieno	mirtenal	aceite de mandarina

ES 2 627 033 T3

carvacrol	furanoedesma-1,3-dieno	acetato de neraldimetilo	de $\alpha$ -terpineno
d-carvona	furanoedesma-1,4-dieno	nerolidol	terpineno 900
1-carvona		nonanona	$\alpha$ -terpineol
óxido de cariofileno	furano germacra 1,10(15)-dien-6-ona	gamma-nonalactona	$\alpha$ -terpinoleno
trans-cariofileno		aceite de poleo	gamma-terpineol
aceite de ricino	furanosesquiterpeno	aceite de oliva	acetato de $\alpha$ -terpinilo
aceite de cedro	aceite de ajo	aceite de naranja dulce	2-terc-butil-p-quinona
camazuleno	geraniol	1-octanol	
1,8-cineol	acetato de geraniol	E ocimenona	$\alpha$ -tujona
cinnamaldehído	germacreno D	Z ocimenona	aceite de tomillo
alcohol cinnamílico	germacreno B	3-octanona	timol
aceite de canela	aceite de pomelo	ocimeno	timil metil éter
citral A	$\alpha$ -gurjuneno	acetato de octilo	gamma-undecalactona
citral B	$\alpha$ -humuleno	aceite de cacahuete	anhídrido valérico
citrate de isopropilo	$\alpha$ -ionona	alcohol perillico	vanillina
citronelal	$\beta$ -ionona	aceite de menta	trans-verbenol
aceite de citronela	isoborneol	$\alpha$ -felandreno	cis-verbenol
citronelol	isofuranogermacreno	$\beta$ -felandreno	verbenona
acetato de citronelilo	iso-mentona	propionato de fenetilo	
formiato de citronelilo	iso-pulegona	fenil acetaldehído	aceite mineral blanco
aceite de clavo	jasmona	$\alpha$ -pineno	alcohol Yomogi
$\alpha$ -copaeno	lecitina	$\beta$ -pineno	zingibereno
aceite de menta japonesa	aceite de limón	aceite de pino	
	aceite de hierbaluisa	trans-pinocarveol	

En algunas realizaciones, las composiciones incluyen dos o más compuestos seleccionados de entre los siguientes compuestos:

Compuestos	Nº. de registro CAS
trans-anetol	4180-23-8
terc-butil-p-benzoquinona	3602-55-9
aceite de comino negro	977017-84-7
borneol	507-70-0
canfeno	79-92-5
beta-cariofileno	87-44-5
cineol	470-82-6
citrate de trietilo	77-93-0
para-cimeno	99-87-6
geraniol	106-24-1
hedion	24851-98-7
heliotropina	120-57-0
Hercolyn D	8050-15-5
aceite de flor de lila	
aceite de lima	
d-limoneno	5989-27-5
linalol	78-70-6
etil linalol	10339-55-6
tetrahidrolinalol	78-69-3
salicilato de metilo	119-36-8
alfa-pineno	80-56-8
beta-Pineno	127-91-3
alfa-Terpineno	99-86-5
alfa-Tujeno	2867-05-2

aceite de tomillo	8007-46-3
timol	89-83-8
aceite de gaulteria	68-917-75-9

En algunas realizaciones, las composiciones incluyen dos o más compuestos seleccionados de entre los siguientes compuestos:

Compuestos	Nº. de registro CAS
trans-anetol	4180-23-8
para-cimeno	99-87-6
linalol	78-70-6
alfa-pineno	80-56-8
timol	89-83-8

5

En algunas realizaciones de las composiciones que incluyen aceite de flor de lila, uno o más de los siguientes compuestos pueden ser sustituidos por aceite de flor de lila: tetrahidrolinalol; etil linalol; heliotropina; hedion; Herculyn D; y citrato de trietilo.

- 10 En algunas realizaciones de las composiciones que incluyen aceite de comino negro, uno o más de los siguientes compuestos pueden ser sustituidos por aceite de comino negro: alfa-tujeno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, *p*-cimeno, limoneno y terc-butil-*p*-benzoquinona.

- 15 En algunas realizaciones de las composiciones que incluyen aceite de tomillo, uno o más de los siguientes compuestos pueden ser sustituidos por aceite de tomillo: timol,  $\alpha$ -tujona;  $\alpha$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -pineno, *p*-cimeno,  $\alpha$ -terpineno, linalol, borneol y  $\beta$ -cariofileno. En algunas realizaciones de las composiciones que incluyen timol, el aceite de tomillo puede ser sustituido. En algunas realizaciones de las composiciones que incluyen aceite de tomillo, puede ser deseable incluir un tipo específico de aceite de tomillo. A este respecto, el aceite de tomillo (blanco) se prefiere al aceite de tomillo (rojo) dado que se ha descubierto que este último causa efectos secundarios negativos para el
- 20 sujeto o huésped.

- Los compuestos usados para preparar realizaciones de las composiciones pueden obtenerse, por ejemplo, de las siguientes fuentes: Millennium Chemicals, Inc. (Jacksonville, FL), Ungerer Company (Lincoln Park, NJ), SAFC (Milwaukee, WI), IFF Inc. (Hazlet, NJ); Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO); y The Lebermuth Company, Inc.
- 25 (Southbend, IN).

- En algunas realizaciones de las composiciones, puede ser deseable incluir una versión de origen natural o una versión sintética de un compuesto. Por ejemplo, en ciertas realizaciones puede ser deseable incluir Lime Oil 410, un aceite de lima sintético que se puede obtener, por ejemplo, de Millennium Chemicals, Inc. En ciertas composiciones
- 30 ejemplares, puede ser deseable incluir un compuesto que está designado que cumple el Food Chemical Codex (FCC), por ejemplo, geraniol Fine FCC o Tetrahidrolinalol FCC, compuestos que pueden obtenerse, por ejemplo, de Millennium Chemicals, Inc.

- En algunas realizaciones de las composiciones, puede ser deseable incluir un compuesto que tenga una pureza
- 35 específica. En algunas realizaciones de las composiciones, puede ser deseable incluir compuestos que tienen, cada uno, una pureza de al menos aproximadamente el 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Por ejemplo, en algunas realizaciones de las composiciones que incluyen alfa-pineno, puede seleccionarse un alfa-pineno que es al menos aproximadamente un
- 40 seleccionarse un linalol que es al menos aproximadamente un 97-99 % puro (por ejemplo linalool coeur).

- En algunas realizaciones de las composiciones, puede ser deseable incluir compuestos que tienen, cada uno, una pureza de aproximadamente el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %. Por ejemplo, en algunas realizaciones de las composiciones que incluyen geraniol, puede ser deseable incluir un geraniol que es al menos
- 45 aproximadamente el 60 %, 85 % o 95 % puro. En algunas realizaciones, puede ser deseable incluir un tipo específico de geraniol. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir: geraniol 60, geraniol 85 o geraniol 95. Cuando se obtiene geraniol como geraniol 60, geraniol 85 o geraniol 95, entonces el cuarenta por ciento, el quince por ciento o el cinco por ciento del aceite puede ser nerol. El nerol es un monoterpeno (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O), que puede extraerse de esencia de rosas, aceite de flores de naranjo y aceite de lavanda.

50

Se describen composiciones que incluyen dos o más compuestos seleccionados de entre los siguientes compuestos: linalol, timol, alfa-pineno, para-cimeno y trans-anetol. Las composiciones pueden incluir dos o más compuestos seleccionados de entre los siguientes compuestos: linalol, timol, alfa-pineno, para-cimeno y trans-anetol. Las composiciones pueden incluir cuatro o más compuestos seleccionados de entre los siguientes compuestos:

- 5 linalol, timol, alfa-pineno, para-cimeno y trans-anetol. Las composiciones pueden incluir: linalol, timol, alfa-pineno, para-cimeno y trans-anetol. En algunas realizaciones, se prefiere que se use un alfa-pineno que es al menos aproximadamente el 98 % puro. En algunas realizaciones, se prefiere que se use un linalol que es un linalool coeur. La composición incluye, además, aceite de soja.
- 10 En algunas realizaciones, las composiciones incluyen: linalol, timol, alfa-pineno, para-cimeno y aceite de soja. En algunas realizaciones, se prefiere que se use un alfa-pineno que es al menos aproximadamente el 98 % puro. En algunas realizaciones, se prefiere que se use un linalol que es un Linalool coeur.

- Tal como se usan en el presente documento, debe entenderse que las cantidades en %, en peso o en volumen, de
- 15 compuestos se refieren a cantidades relativas de los compuestos. Por lo tanto, por ejemplo, puede decirse que una composición que incluye el 7 % de linalol, el 35 % de timol, el 4 % de alfa-pineno, el 30 % de para-cimeno y el 24 % de aceite de soja ( % en vol/vol) incluye una relación de 7 a 35 a 4 a 30 a 24 de linalol, timol, alfa-pineno, para-cimeno y aceite de soja, respectivamente (en volumen). Por lo tanto, si un compuesto se retira de la composición, o se añaden compuestos adicionales u otros ingredientes a la composición, se contempla que los compuestos
- 20 restantes puedan proporcionarse en las mismas cantidades relativas. Por ejemplo, si se retiró aceite de soja de la composición ejemplar, la composición resultante incluiría de 7 a 35 a 4 a 40 de linalol, timol, alfa-pineno y para-cimeno, respectivamente (en volumen). Esta composición resultante incluiría el 9,21 % de linalol, el 46,05 % de timol, el 5,26 % de alfa-pineno y el 39,48 % de para-cimeno ( % en vol/vol). Como otro ejemplo, si se añadió aceite de cártamo a la composición original para dar una composición final que contiene el 40 % (vol/vol) de aceite de
- 25 cártamo, entonces la composición resultante incluiría el 4,2 % de linalol, el 21 % de timol, el 2,4 % de alfa-pineno, el 18 % de para-cimeno, el 14,4 % de aceite de soja, y el 40 % de aceite de cártamo ( % en vol/vol).

- En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 1-5 %, o aproximadamente el 5-10 % de linalol, según lo medido en volumen ( % en vol/vol). En algunas realizaciones, la composición incluye
- 30 aproximadamente el 4,5 - 5,5 %, de linalol, según lo medido en volumen. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 5 %, de linalol, según lo medido en volumen. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 6,5-7,5 %, de linalol, según lo medido en volumen. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 7 %, de linalol, según lo medido en volumen.

- 35 En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 4,2-5,2 %, de linalol, según lo medido en peso. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 4,7 %, de linalol, según lo medido en peso. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 6,1-7,1 %, de linalol, según lo medido en peso. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 6,6 %, de linalol, según lo medido en
- 40 peso.

- En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 35-40 %, o aproximadamente el 40-45 % de timol, según lo medido en volumen ( % en vol/vol). En algunas realizaciones, la composición incluye
- 45 aproximadamente el 38-40 %, de timol, según lo medido en volumen. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 39 %, de timol, según lo medido en volumen. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 36-38 %, de timol, según lo medido en volumen. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 37 %, de timol, según lo medido en volumen. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 34-36 %, de timol, según lo medido en volumen. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 35 %, de timol, según lo medido en volumen.

- 50 En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 35-40 %, o aproximadamente el 40-45 % de timol, según lo medido en peso ( % en p/p). En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 40,3-41,3 %, de timol, según lo medido en peso. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 40,8 %, de timol, según lo medido en peso. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 36,7-37,7 %, de timol, según lo medido en peso. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente
- 55 el 37,2 %, de timol, según lo medido en peso.

- En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 1-5 %, o aproximadamente el 5-10 % de alfa-pineno, según lo medido en volumen ( % en vol/vol). En algunas realizaciones, la composición incluye
- 60 aproximadamente el 1,5-2,5 %, de alfa-pineno, según lo medido en volumen. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 2 %, de alfa-pineno, según lo medido en volumen. En algunas

realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 4,5-5,5 %, de alfa-pineno, según lo medido en volumen. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 5 %, de alfa-pineno, según lo medido en volumen. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 3,5-4,5 %, de alfa-pineno, según lo medido en volumen. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 4 %, de alfa-pineno, según lo medido en volumen.

En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 1,4-2,4 %, de alfa-pineno, según lo medido en peso. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 1,9 %, de alfa-pineno, según lo medido en peso. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 4,2-5,2 %, de alfa-pineno, según lo medido en peso. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 4,7 %, de alfa-pineno, según lo medido en peso. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 3,3-4,3 %, de alfa-pineno, según lo medido en peso. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 3,8 %, de alfa-pineno, según lo medido en peso.

En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 25-30 %, o aproximadamente el 30-35 % de para-cimeno, según lo medido en volumen ( % en vol/vol). En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 29,5-30,5 %, de para-cimeno, según lo medido en volumen. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 30 %, de para-cimeno, según lo medido en volumen.

En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 33,9-34,9 %, de para-cimeno, según lo medido en peso. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 34,4 %, de para-cimeno, según lo medido en peso. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 27,9-28,9 %, de para-cimeno, según lo medido en peso. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 28,4 %, de para-cimeno, según lo medido en peso.

En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 1-5 %, aproximadamente el 5-10 %, aproximadamente el 10-15 %, aproximadamente el 15-20 %, aproximadamente el 20-25 %, aproximadamente el 25-30 %, aproximadamente el 30-35 %, aproximadamente el 35-40 %, aproximadamente el 40-45 %, aproximadamente el 45-50 %, aproximadamente el 50-60 %, aproximadamente el 60-75 % o aproximadamente el 75-99 % de trans-anetol, según lo medido en volumen ( % en vol/vol). En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 16,5-17,5 %, de trans-anetol, según lo medido en volumen. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 17 %, de trans-anetol, según lo medido en volumen.

En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 1-5 %, aproximadamente el 5-10 %, aproximadamente el 10-15 %, aproximadamente el 15-20 %, aproximadamente el 20-25 %, aproximadamente el 25-30 %, aproximadamente el 30-35 %, aproximadamente el 35-40 %, aproximadamente el 40-45 %, aproximadamente el 45-50 %, aproximadamente el 50-60 %, aproximadamente el 60-75 % o aproximadamente el 75-99 % de trans-anetol, según lo medido en peso ( % en p/p). En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 17,7-18,7 %, de trans-anetol, según lo medido en peso. En algunas realizaciones, la composición incluye aproximadamente el 18,2 %, de trans-anetol, según lo medido en peso.

Se describe una composición que incluye los siguientes compuestos en las siguientes cantidades relativas, donde las cantidades relativas de los compuestos se expresan como % en p/p: el 18,2 % de trans-anetol, el 34,4 % de para-cimeno, el 4,7 % de linalol, el 1,9 % de alfa-pineno y el 40,8 % de timol.

En algunas realizaciones, la composición incluye los siguientes compuestos en las siguientes cantidades relativas, donde las cantidades relativas de los compuestos se expresan como % en p/p: el 25-35 % de para-cimeno, el 1-10 % de linalol, el 1-10 % de alfa-pineno, el 20-30 % de aceite de soja y el 35-45 % de timol. En algunas realizaciones, la composición incluye los siguientes compuestos en las siguientes cantidades relativas, donde las cantidades relativas de los compuestos se expresan como % en p/p: el 28,39 % de para-cimeno, el 6,6 % de linalol, el 3,8 % de alfa-pineno, el 24 % de aceite de soja y el 37,2 % de timol.

En algunas realizaciones, la composición incluye los siguientes compuestos en las siguientes cantidades relativas, donde las cantidades relativas de los compuestos se expresan como % en vol/vol: el 25-35 % de para-cimeno, el 1-10 % de linalol, el 1-10 % de alfa-pineno, el 20-30 % de aceite de soja y el 35-45 % de timol. En algunas realizaciones, la composición incluye los siguientes compuestos en las siguientes cantidades relativas, donde las cantidades relativas de los compuestos se expresan como % en vol/vol: el 30 % de para-cimeno, el 7 % de linalol, el 4 % de alfa-pineno, el 24 % de aceite de soja y el 35 % de timol.

Sorprendentemente, mediante mezcla de ciertos compuestos en ciertas cantidades relativas, la composición

resultante demuestra un efecto anti-parasitario que supera el efecto antiparasitario de cualquier componente de la composición. Tal como se usa en el presente documento, "componente de una composición" se refiere a un compuesto, o un subconjunto de compuestos incluidos en una composición, por ejemplo, la composición completa menos al menos un compuesto. Tal como se usa en el presente documento, un "efecto anti-parasitario" se refiere a cualquier parámetro medible relacionado con la eficacia de una composición para el tratamiento de una infección parasitaria. El efecto puede ser un parámetro relacionado con la viabilidad, la destrucción, la profilaxis, o cualquier otro parámetro útil y cuantificable para un punto temporal establecido, o puede ser el tiempo para alcanzar un resultado definido, por ejemplo, el tiempo para alcanzar un 100 % de destrucción con una dosis establecida. A este respecto, cuando se comparan un primer efecto y un segundo efecto, el primer efecto puede indicar una mayor eficacia para el tratamiento de una infección parasitaria si supera el segundo efecto. Por ejemplo, cuando el efecto que se mide es un tiempo para alcanzar el 100 % de destrucción, un tiempo más corto es un efecto anti-parasitario que supera un tiempo más largo. Como otro ejemplo, cuando el efecto que se mide es un % de destrucción de parásitos diana, un mayor % de destrucción es un efecto anti-parasitario que supera un menor % de destrucción. Los efectos que se pueden medir incluyen, aunque no se limitan a: el tiempo para destruir un porcentaje dado de un parásito diana *in vivo* o *in vitro*; el porcentaje de viabilidad o el porcentaje de destrucción de un parásito diana *in vivo* o *in vitro*; el porcentaje de viabilidad de los huevos de un parásito diana; el porcentaje de una población huésped que se cura de una infestación por un parásito diana; el porcentaje de una población huésped que está protegida contra la infección por un parásito diana (efecto profiláctico); la perturbación de un mensaje celular o señal celular en un parásito diana, tal como, por ejemplo, calcio, AMP cíclico, y similares; y la disminución de la actividad o efectos cadena abajo de una diana molecular en un parásito diana.

Un procedimiento *in vivo* ejemplar para valorar el efecto anti-parasitario de una composición particular, o componente de la composición, puede llevarse a cabo usando animales huésped. Los animales huésped se infectan con un parásito diana. La composición o componente de interés se administra al animal huésped. La administración de la composición o componente de interés puede iniciarse en diversos momentos antes y/o después de la infección del animal huésped, dependiendo del parásito diana que está siendo ensayado. Los huevos generados por el parásito en el animal huésped se cuantifican. Por ejemplo, los huevos en una muestra de heces recogidas del animal pueden cuantificarse. La cuantificación de los huevos generados por el parásito en el animal huésped que recibe la composición o componente de interés se puede comparar con la cuantificación de huevos generados por el parásito en otro animal huésped, tal como un animal huésped que recibe otra composición o componente de interés, o un animal huésped que sirve como control, por ejemplo, control no infectado, o control no tratado.

Un procedimiento *in vivo* ejemplar para valorar el efecto anti-parasitario de una composición particular, o componente de la composición, puede llevarse a cabo usando parásitos diana proporcionados en placas de ensayo. La composición o componente de interés se pone en contacto con los parásitos diana, y se observa el efecto, por ejemplo, el efecto de la composición o componente de interés sobre la vitalidad de los parásitos diana. El efecto del tratamiento sobre los parásitos diana se puede comparar con el efecto de otro tratamiento sobre parásitos diana, tales como parásitos diana tratados con otra composición o componente de interés, o parásitos diana que sirve como control, por ejemplo, control no infectado, o control no tratado.

Pueden usarse otros procedimientos para valorar el efecto antiparasitario de una composición o componente particular, procedimientos que serán evidentes para un experto en la materia, o pueden ser determinados para uso en un caso particular por un experto en la materia usando experimentación rutinaria solamente. Información adicional relacionada con la valoración del efecto anti-parasitario se puede encontrar en los ejemplos expuestos en este documento.

En algunas realizaciones, se consigue un efecto anti-parasitario sinérgico cuando se combinan ciertos compuestos, y el efecto sinérgico se puede mejorar cuando ciertos compuestos se combinan en ciertas cantidades o relaciones relativas. En otras palabras, las composiciones que incluyen ciertas combinaciones de los compuestos pueden tener una capacidad mejorada para tratar infecciones parasitarias, en comparación con cada uno de los compuestos tomados solos.

Tal como se usa en el presente documento, "sinergia" y "efecto sinérgico" pueden referirse a cualquier mejora sustancial, en una composición de al menos dos compuestos, de un efecto medible, por ejemplo, un efecto anti-parasitario, en comparación con el efecto de un componente de la composición, por ejemplo, un compuesto activo solo, o la mezcla de compuestos completa menos al menos un compuesto. La sinergia es una característica específica de una mezcla de compuestos, y está por encima de cualquier nivel de fondo de mejora que sería debida únicamente a, por ejemplo, efectos aditivos de cualquier combinación aleatoria de ingredientes.

En algunas realizaciones, una mejora sustancial de un efecto medible puede expresarse como un coeficiente de

sinergia. Un coeficiente de sinergia es una expresión de una comparación entre los efectos medidos de una composición y los efectos medidos de una composición de comparación. La composición de comparación puede ser un componente de la composición. En algunas realizaciones, el coeficiente de sinergia se puede ajustar para diferencias en la concentración de la mezcla completa y la composición de comparación.

5

Los coeficientes de sinergia pueden calcularse de la siguiente manera. Una relación de actividad (R) también puede calcularse dividiendo el % de efecto de la composición ( $A_B$ ) por el % de efecto de la composición de comparación ( $X_n$ ), de la siguiente manera:

10 
$$R = A_B/X_n$$
 **Fórmula 1**

Un factor de ajuste de la concentración (F) puede calcularse basándose en la concentración ( $C_n$ ), es decir, % (p/p) o % (vol/vol), o la composición de comparación en la composición, de la siguiente manera:

15 
$$F = 100/C_n$$
 **Fórmula 2**

El coeficiente de sinergia (S) puede calcularse a continuación multiplicando la relación de actividad (R) y el factor de ajuste de la concentración (F), de la siguiente manera:

20 
$$S = (R)(F)$$
 **Fórmula 3**

Por lo tanto, el coeficiente de sinergia (S) también puede calcularse, de la siguiente manera:

25 
$$S = [(A_B/X_n)(100)]C_n$$
 **Fórmula 4**

En la fórmula 4,  $A_B$  se expresa como % de efecto de la mezcla,  $X_n$  se expresa como % del efecto de la composición de comparación ( $X_n$ ), y  $C_n$  se expresa como % (p/p) o % (vol/vol) de concentración de la composición de comparación en la mezcla.

30 En algunas realizaciones, un coeficiente de sinergia de aproximadamente 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 o 1,5 puede ser sustancial y deseable comercialmente. En otras realizaciones, el coeficiente de sinergia puede ser de aproximadamente 1,6 a aproximadamente 5, incluyendo aunque sin limitación a aproximadamente 1,8, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 y 4,5. En otras realizaciones, el coeficiente de sinergia puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 50, incluyendo aunque sin limitación a aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 45. En otras  
35 realizaciones, el coeficiente de sinergia puede ser de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 o más, incluyendo aunque sin limitación a aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400 y 450. Cualquier coeficiente de sinergia por encima de 500 también está contemplado dentro de realizaciones de las composiciones.

Dado que se puede encontrar un amplio intervalo de sinergias en diversas realizaciones descritas en el presente documento, se indica expresamente que un coeficiente de sinergia puede describirse como "mayor que" un número dado y, por lo tanto, no necesariamente limitado a estar dentro de los límites de un intervalo que tiene un límite numérico inferior y superior. Del mismo modo, en algunas realizaciones descritas en el presente documento, ciertos coeficientes de sinergia bajos, o los extremos inferiores de los intervalos, están expresamente excluidos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la sinergia puede expresarse como "mayor que" un número dado que  
45 constituye un límite inferior de sinergia para dicha realización. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el coeficiente de sinergia es igual o mayor que 25; en dicha realización, todos los coeficientes de sinergia inferiores a 25, incluso aunque sean sustanciales, se excluyen expresamente.

En algunas realizaciones, la sinergia o el efecto sinérgico asociados con una composición pueden determinarse usando cálculos similares a los descritos en Colby, S. R., "Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations," Weeds (1967) 15:1, págs. 20-22, que se incorpora en el presente documento como referencia. A este respecto, la siguiente fórmula puede usarse para expresar un % de efecto esperado (E) de una composición que incluye dos compuestos, el compuesto X y el compuesto Y:

55 
$$E = X + Y - (X*Y/100)$$
 **Fórmula 5**

En la fórmula 5, X es el % de efecto real medido del compuesto X en la composición, e Y es el % de efecto real medido del compuesto Y de la composición. El % de efecto esperado (E) de la composición se compara a continuación con un % de efecto real medido (A) de la composición. Si el % de efecto real (A) que se mide difiere  
60 del % de efecto esperado (E), tal como se calcula mediante la fórmula, entonces la diferencia se debe a una

interacción de los compuestos. Por lo tanto, la composición tiene sinergia (una interacción positiva de los compuestos) cuando  $A > E$ . Además, hay una interacción negativa (antagonismo) cuando  $A < E$ .

La fórmula 5 puede extenderse para representar cualquier número de compuestos en una composición; sin embargo, se vuelve más compleja a medida que se expande, tal como se ilustra mediante la siguiente fórmula para una composición que incluye tres compuestos, compuesto X, compuesto Y y compuesto Z:

$$E = X + Y + Z - ((XY + XZ + YZ)/100) + (X*Y*Z/10000) \quad \text{Fórmula 6}$$

10 Se puede proporcionar una fórmula fácil de usar que tiene en cuenta composiciones con cualquier número de compuestos mediante la modificación de las fórmulas 5 y 6. Dicha modificación de la fórmula se describirá a continuación. Cuando se usan las fórmulas 5 y 6, un valor de control no tratado (no tratado con la composición o el compuesto) se establece al 100 %, por ejemplo, si el efecto que está siendo medido en la cantidad de parásitos diana destruidos, el valor de control se establecería en el 100 % de supervivencia del parásito diana. A este respecto, si el tratamiento con el compuesto A da como resultado un 80 % de destrucción de un parásito diana, entonces puede decirse que el tratamiento con el compuesto A da como resultado un 20 % de supervivencia, o un 20 % del valor de control. Las relaciones entre valores expresados como un porcentaje de efecto y valores expresados como un porcentaje de control se muestran en las siguientes fórmulas, donde E' es el % esperado de control de la composición,  $X_n$  es el % de efecto real medido de un compuesto individual (compuesto  $X_n$ ) de la composición,  $X_n'$  es el % de control de un compuesto individual de la composición, y A' es el % medido real de control de la composición.

$$E = 100 - E' \quad \text{Fórmula 7}$$

25  $X_n = 100 - X_n' \quad \text{Fórmula 8}$

$$A = 100 - A' \quad \text{Fórmula 9}$$

30 Sustituyendo por el porcentaje de valores de control el porcentaje de valores de efecto de las fórmulas 5 y 6, y realizando modificaciones para tener en cuenta cualquier número (n) de compuestos, se proporciona la siguiente fórmula para calcular el % esperado de control (E') de la composición:

$$E' = \left( \prod_{i=1}^n X_i' \right) \div 100^{n-1}$$

Fórmula 10

35 De acuerdo con la fórmula 10, el % esperado de control (E') para la composición se calcula dividiendo el producto del % real medido de los valores de control ( $X_n'$ ) para cada compuesto de la composición por  $100^{n-1}$ . El % esperado de control (E') de la composición se compara a continuación con un % real medido de control (A') de la composición. Si el % real de control (A') que se mide difiere del % esperado de control (E'), tal como se calcula mediante la fórmula 10, entonces la diferencia se debe a una interacción de los compuestos. Por lo tanto, la composición presenta sinergia (una interacción positiva de los compuestos) cuando  $A' < E'$ . Además, existe una interacción negativa (antagonismo) cuando  $A' > E'$ .

45 Las composiciones que contienen dos o más compuestos en ciertas relaciones o cantidades relativas pueden ser ensayados para un efecto sinérgico mediante la comparación del efecto anti-parasitario de una composición de compuestos particular con el efecto anti-parasitario de un componente de la composición. Información adicional relacionada con la realización de una determinación de la sinergia se puede encontrar en los ejemplos expuestos en este documento.

50 Se contempla que las composiciones del objeto divulgado en el presente documento podrían formularse para y administrarse mediante vehículos, incluyendo productos alimentarios. Por ejemplo, los aditivos se añaden a productos horneados, tales como galletas, pan, pasteles, etc., para mejorar o modificar el sabor o el color, aumentar la vida útil, mejorar su valor nutricional y, en general, producir un efecto deseado. Del mismo modo, las composiciones del objeto divulgado en el presente documento podrían formularse con productos alimentarios como vehículos y administrarse por ingestión para producir su efecto deseado. Por supuesto, podrían utilizarse numerosos tipos de alimentos para administrar las composiciones, incluyendo aunque sin limitarse a: bebidas, cereales para el

desayuno y mezclas de bebidas en polvo.

- Además, las composiciones divulgadas en el presente documento pueden asumir formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos u acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como
- 5 agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Para administración oral, las composiciones pueden asumir la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas mediante una técnica convencional con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno fosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo,
- 10 almidón de patata o almidón glicolato sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos se pueden revestir mediante procedimiento conocidos en la técnica. Por ejemplo, una composición divulgada en el presente documento puede formularse teniendo un revestimiento entérico o de liberación retardada que protege la composición hasta que alcanza el colon.
- 15 Las preparaciones líquidas para administración oral pueden asumir la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse mediante técnicas convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas hidrogenadas comestibles), agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia), vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados) y
- 20 conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o de propilo o ácido sórbico). Las preparaciones líquidas para administración oral también pueden formularse para liberación retardada, tal como por ejemplo en "cápsulas de gel".

- En ciertas realizaciones, las composiciones podrían proporcionarse en una forma encapsulada o microencapsulada.
- 25 La microencapsulación es un proceso donde las pequeñas partículas de la composición están revestidas o encapsuladas con un material de envuelta externa para controlar la liberación de la composición o para proteger la composición. El material de envuelta externa ejemplar incluye proteínas, polisacáridos, almidones, ceras, grasas, polímeros naturales y sintéticos, y resinas. La microencapsulación puede realizarse química o físicamente. Por ejemplo, los procedimientos físicos de encapsulación de las composiciones podrían incluir: secado por pulverización,
- 30 enfriamiento por pulverización, revestimiento mediante bombo o coextrusión. Los procedimientos químicos de encapsulación pueden incluir coacervación, separación de fases, extracción con disolvente o evaporación del disolvente.

- Como un ejemplo, para la coextrusión de un núcleo líquido, materiales del núcleo líquido y de envuelta son
- 35 bombeados a través de orificios concéntricos, con el material del núcleo fluyendo en el orificio central, y el material de envuelta fluyendo a través del anillo externo. Una gota de compuesto encerrado se forma cuando una gotita de fluido de núcleo es recubierta por una capa de fluido de la envuelta. La envuelta se endurece a continuación por medios apropiados; por ejemplo, por reticulación química en el caso de los polímeros, refrigeración en el caso de las grasas o ceras, o evaporación del disolvente. Información adicional acerca de los procedimientos y sistemas para
- 40 proporcionar composiciones formuladas para y administradas a través de los productos alimentarios puede encontrarse en las patentes de Estados Unidos números. 5.418.010, 5.407.609, 4.211.668, 3.971.852 y 3.943.063.

- Las composiciones del objeto divulgado en el presente documento pueden usarse para tratar infecciones parasitarias en un sujeto mamífero. El objeto divulgado en el presente documento incluye procedimientos para tratar
- 45 una infección parasitaria en un sujeto, que incluyen administrar una cantidad efectiva de una composición descrita en el presente documento.

- Tal como se usan en el presente documento, los términos "huésped" y "sujeto" se usan de forma intercambiable y se refieren a un animal capaz de ser infectado por un parásito. El animal puede ser un vertebrado. El vertebrado puede
- 50 ser de sangre caliente. El vertebrado de sangre caliente puede ser un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano. El ser humano puede ser un adulto o un niño. Tal como se usan en el presente documento, los términos "huésped" y "sujeto" incluyen huéspedes y sujetos humanos y animales. Por lo tanto, se proporcionan usos terapéuticos veterinarios de acuerdo con el objeto divulgado en el presente documento. Por tanto, el objeto divulgado en el presente documento posibilita el tratamiento de mamíferos tales como seres humanos, así como
- 55 aquellos mamíferos de importancia debido al peligro de extinción, tales como los tigres siberianos o leopardos de las nieves; de importancia económica, tales como animales criados en granjas para el consumo por seres humanos; y/o animales de importancia social para los seres humanos, tales como animales mantenidos como mascotas o en zoológicos. Ejemplos de dichos animales incluyen, aunque no se limitan a: carnívoros tales como gatos y perros; ganado porcino, incluyendo cerdos, puercos y jabalíes; rumiantes y/o ungulados tales como vacas, bueyes, ovejas,
- 60 jirafas, ciervos, cabras, bisontes y camélidos; y caballos. También se proporciona el tratamiento de aves, incluyendo

el tratamiento de aquellos tipos de aves que están en peligro y/o mantenidas en zoológicos, así como aves, y más particularmente aves domesticadas, es decir, aves de corral, tales como pavos, pollos, patos, gansos, gallinas de Guinea, y similares, ya que también son de importancia económica para los seres humanos. Por lo tanto, también se proporciona el tratamiento de ganado, incluyendo, aunque sin limitarse a, ganado porcino domesticado, rumiantes, 5 ungulados, caballos (incluyendo caballos de carreras), aves de corral, y similares.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refieren a: conferir protección contra la infección; prevenir la infección; aliviar la infección; reducir la gravedad de los síntomas y/o secuelas de la infección; eliminar la infección; y/o prevenir la recaída de la infección. Tal como se usan en el 10 presente documento, los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" también se refieren a conferir protección contra, prevenir, aliviar, reducir la gravedad de, eliminar y/o prevenir la recaída asociada con una enfermedad o los síntomas causados por una infección parasitaria.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad efectiva" se refiere a una dosis suficiente para 15 proporcionar tratamiento para una infección parasitaria. La cantidad exacta que se requiere puede variar, por ejemplo, dependiendo del parásito diana, el tratamiento que está siendo asignado, la edad y el estado general del sujeto, la formulación particular que está siendo utilizada, la vía de administración, y similares. Por tanto, la cantidad efectiva puede variar en función de las circunstancias particulares, y una cantidad efectiva apropiada puede ser determinada en un caso particular por un experto en la materia usando solo experimentación rutinaria.

20 Se describen procedimientos de cribado para composiciones útiles para el tratamiento de una infección parasitaria. El procedimiento de cribado es útil para reducir el alcance de los posibles compuestos que son identificados como componentes para una composición para el tratamiento de una infección parasitaria en un sujeto mamífero.

25 Se describe un procedimiento de selección de una composición para uso en el tratamiento de una infección parasitaria que incluye lo siguiente. Una célula que expresa un receptor de tiramina se proporciona y se pone en contacto con compuestos de ensayo. Se mide la afinidad de unión al receptor de los compuestos. Se mide al menos un parámetro seleccionado de entre los siguientes parámetros: nivel de AMPc intracelular, y nivel de  $Ca^{2+}$  intracelular. Se identifica un primer compuesto para la composición, que es capaz de alterar al menos uno de los 30 parámetros, y que tiene una alta afinidad de unión por el receptor de tiramina; y se identifica un segundo compuesto para la composición, que es capaz de alterar al menos uno de los parámetros, y que tiene una baja afinidad de unión por el receptor de tiramina. Se selecciona una composición que incluye los primer y segundo compuestos. Se selecciona una composición que incluye los primer y segundo compuestos y demuestra un efecto anti-parasitario que supera el efecto anti-parasitario de cualquiera de los compuestos cuando se usan solos.

35 La célula usada para el procedimiento puede ser cualquier célula capaz de ser transfectada con y expresar un receptor de tiramina (TyrR). Los ejemplos de células incluyen, aunque no se limitan a: células de insectos, tales como células de Schneider de *Drosophila*, células de Schneider 2 de *Drosophila* (células S2), y células de *Spodoptera frugiperda* (por ejemplo, Sf9 o Sf21); o células de mamífero, tales como células de riñón embrionario 40 humano (células HEK-293), células de fibroblastos de riñón de mono verde africano (células COS-7), células HeLa, y células de queratinocitos humanos (células HaCaT). Información adicional acerca de la preparación de células que expresan receptores se puede encontrar en las solicitudes de patente de Estados Unidos con números de serie 10/832.022; 11/086.615; y 11/365.426.

45 El receptor de tiramina (TyrR) puede ser un TyrR de longitud completa, un fragmento funcional de un TyrR, o una variante funcional de un TyrR. Un fragmento funcional de un TyrR es un TyrR en el que los residuos de aminoácidos se delecionan en comparación con el polipéptido de referencia, es decir, TyrR de longitud completa, pero donde la secuencia de aminoácidos restante conserva la afinidad de unión del polipéptido de referencia por tiramina. Una variante funcional de un TyrR es un TyrR con inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, o 50 sustituciones conservativas de aminoácidos, que conserva la afinidad de unión del polipéptido de referencia por tiramina. Una "sustitución de aminoácidos preservadora" es una sustitución de un residuo de aminoácido con un residuo funcionalmente similar. Ejemplos de sustituciones preservadoras incluyen la sustitución de un residuo no polar (hidrófobo) tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro; la sustitución de un residuo polar (hidrófilo) por otro tal como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre glicina y serina; la sustitución de un 55 residuo básico tal como lisina, arginina o histidina por otro; o la sustitución de un residuo ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro. Una sustitución de aminoácidos conservativa también incluye la sustitución de un residuo con un residuo derivatizado químicamente, siempre que el resultante conserve la afinidad de unión del polipéptido de referencia por tiramina. Los ejemplos de TyrR incluyen, aunque no se limitan a: TyrR, tales como, TyrR de *Drosophila melanogaster* (número de entrada al GENBANK® (GAN) CAA38565), TyrR de *Locusta 60 migratoria* (GAN: Q25321), TyrR de otros invertebrados, y TyrR de nematodos, incluyendo *Ascaris*.

Se pueden emplear otros receptores, tales como receptores acoplados a proteína G (GPCR), ya tenga afinidad nativa por tiramina u otros ligandos, en procedimientos de cribado para composiciones útiles para tratar una infección parasitaria. Los ejemplos de receptores que pueden usarse incluyen, aunque no se limitan a: *Anopheles gambiae* (GAN: EAA07468), *Heliothis virescens* (GAN: Q25188), *Mamestra brassicae* (GAN: AAK14402), *Tribodinium castaneum* (GAN: XP\_970290), *Aedes aegypti* (GAN: EAT41524), *Boophilus microplus* (GAN: CAA09335); *Schistosoma mansoni* (GAN: AAF73286); y *Schistosoma mansoni* (GAN: AAW21822).

Algunos de los receptores divulgados en el presente documento presentan referencias cruzadas a los números de entrada al GENBANK®.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "afinidad de unión al receptor" se refiere a una interacción entre una composición o componente, por ejemplo, compuesto, y un sitio de unión al receptor. La interacción entre una composición o componente, y el sitio de unión al receptor, puede identificarse como específica o inespecífica. La especificidad de una interacción entre una composición o componente, y un sitio de unión a TyrR, se puede determinar de la siguiente manera. Se proporcionan una mosca de tipo silvestre (*Drosophila melanogaster*) y una mosca mutante, donde la mosca mutante carece de un TyrR. Las moscas de tipo silvestre y mutante se exponen a una composición o componente de interés. Si la exposición afecta negativamente a la mosca de tipo silvestre, (por ejemplo, derribo, muerte), pero no afecta negativamente a la mosca mutante, entonces puede decirse que el tratamiento con la composición o componente de interés es específico para el TyrR. Si la exposición afecta negativamente a la mosca de tipo silvestre, y a la mosca mutante, entonces puede decirse que el tratamiento con la composición o componente de interés es inespecífico para el TyrR.

Una "alta afinidad de unión al receptor" puede ser una interacción específica entre una composición o componente, y el sitio de unión al receptor. Se descubre una alta afinidad de unión al receptor cuando la constante de disociación en equilibrio ( $K_d$ ) es menor de aproximadamente 100 nM, 75 nM, 50 nM, 25 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM o 2 nM. Se descubre una alta afinidad de unión al receptor cuando la constante de disociación de inhibidor en equilibrio ( $K_i$ ) es menor de aproximadamente 100  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M o 2  $\mu$ M, cuando compite con tiramina. Se descubre una alta afinidad de unión al receptor cuando la concentración efectiva a la que la unión a tiramina es inhibida un 50 % ( $CE_{50}$ ) es menor de aproximadamente 500  $\mu$ M, 400  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 25  $\mu$ M o 10  $\mu$ M.

Una "baja afinidad de unión al receptor" puede ser una interacción inespecífica entre una composición o componente, y el sitio de unión al receptor. En algunas realizaciones, se descubre una baja afinidad de unión al receptor cuando la constante de disociación en equilibrio ( $K_d$ ) es mayor de aproximadamente 100 nM, 125 nM, 150 nM, 175 nM, 200 nM, 225 nM o 250 nM. En algunas realizaciones, se descubre una baja afinidad de unión al receptor cuando la constante de disociación de inhibidor en equilibrio ( $K_i$ ) es mayor de aproximadamente 100  $\mu$ M, 125  $\mu$ M, 150  $\mu$ M, 175  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 225  $\mu$ M o 250  $\mu$ M, cuando compite con tiramina. Se descubre una baja afinidad de unión al receptor cuando la concentración efectiva a la que la unión a tiramina es inhibida un 50 % ( $CE_{50}$ ) es mayor de aproximadamente 500  $\mu$ M, 625  $\mu$ M, 750  $\mu$ M, 875  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M, 1125  $\mu$ M o 1250  $\mu$ M.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece el objeto divulgado en el presente documento. Aunque pueden usarse cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo del objeto divulgado en el presente documento, a continuación se describen los procedimientos y materiales representativos

Siguiendo una convención legal de patentes consolidada, los términos "un", "una" y "el" se refieren a "uno o más" cuando se usan en esta solicitud, incluyendo las reivindicaciones. De este modo, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de dichas células, y así sucesivamente.

Tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor o a una cantidad de masa, peso, tiempo, volumen, concentración o porcentaje abarca variaciones de en algunas realizaciones  $\pm$  20 %, en algunas realizaciones  $\pm$  10 %, en algunas realizaciones  $\pm$  5 %, en algunas realizaciones  $\pm$  1 %, en algunas realizaciones  $\pm$  0,5 %, y en algunas realizaciones  $\pm$  0,1 % de la cantidad especificada, ya que dichas variaciones son apropiadas para llevar a cabo el procedimiento descrito.

El objeto divulgado en el presente documento se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos específicos pero no limitantes. Los siguientes ejemplos pueden incluir las compilaciones de datos que son representativos de los datos recopilados en distintos momentos en el transcurso del desarrollo y experimentación en relación con el objeto

divulgado en el presente documento. Los siguientes ejemplos incluyen ejemplos proféticos.

## **EJEMPLOS**

### **5 EJEMPLOS 1-3**

Un ejemplo de un parásito que infecta comúnmente a seres humanos es *Hymenolepis nana*, que es un parásito intestinal. *H. nana* es un gusano difícil de eliminar del intestino humano. Véase John Rim, Treatment of Hymenodepis nana infection. Post-Graduate Doctor Journal. Middle East Edition, 5: 330-334, 1985. *H. nana* se encuentra en todo el mundo y la infección puede producirse en seres humanos de cualquier edad; sin embargo, debido a la mayor probabilidad de exposición a heces humanas, los niños pequeños presentan el mayor riesgo de contraer himenolepiasis, la enfermedad asociada con infección por *H. nana*.

*H. nana* tiene un ciclo de vida característico de aproximadamente 7 días. Cuando un huésped ha sido infectado, los huevos de *H. nana* pasan al íleo del intestino delgado y eclosionan en oncosferas, larvas móviles de *H. nana*, que penetran en la lámina propia de las vellosidades del intestino delgado. En el plazo de aproximadamente 3 a 4 días, las larvas maduran a cisticercoides pre-adultos, que a continuación entran en la luz intestinal, fijándose a la mucosa de las vellosidades del intestino delgado. Muchas infecciones son asintomáticas, lo que evita que algunos individuos infectados busquen tratamiento médico y sean curados. Las formas sintomáticas de la infección se caracterizan por irritabilidad, diarrea, dolor abdominal, sueño agitado, prurito anal, prurito nasal, trastornos de comportamiento y convulsiones.

En los presentes ejemplos, *Hymenodepis nana* se selecciona como un parásito ejemplar usado para estudiar la eficacia *in vitro* e *in vivo* de composiciones divulgadas en el presente documento para tratar infecciones parasitarias. Ratones suizos albinos criados en laboratorio se usaron como animales huésped. Se usan machos y hembras no infectados. Las hembras embarazadas se aíslan de otros ratones. Las crías recién nacidas son mantenidas para evitar infección de las mismas. Los ratones madre se verifican dos veces por semana mediante frotis fecal con solución salina directa y la muestra negativa se examina de nuevo mediante técnicas de flotación por centrifugado con sulfato de zinc y sedimentación con solución salina para excluir a aquellos parasitológicamente infectados. Véase Melvin y Brooke, Laboratory procedures for the diagnosis of intestinal parasites. DHEW Publications No. (CDC) 76-828, Public Health Services, 1975, incorporado en el presente documento como referencia en su totalidad.

Después del destete las crías, los ratones se verifican dos veces por semana y las crías no infectadas se usan para los ejemplos. Los ratones se mantienen en condiciones higiénicas escrupulosas y se alimentaron con leche un día y trigo otro día. La dieta y el agua están disponibles *ad libitum*.

Huevos de *H. nana*, libres de residuos, extraídos de segmentos grávidos, se usan para infección. Véase Ito, In vitro oncospherical agglutination given by immune sera from mice infected and rabbits injected with eggs of Hymenolepis nana. Parasitol., 71: 465, 1975, incorporado en el presente documento como referencia en su totalidad. Antes de la inoculación, las cáscaras de los huevos se retiran y a cada ratón se le inocula con un número conocido de huevos para mantener el ciclo de infección. Véase Bernetzen y Voge, In vitro hatching of oncosphere of Hymenolepidid cestodes. J. Parasitol., 5: 235, 1965, incorporado en el presente documento como referencia en su totalidad.

La dosis máxima tolerada (DMT) de cada agente de ensayo se determina antes de comenzar el estudio *in vivo*. En el experimento se usan ratones de 5 semanas de edad (25-30 gramos) libres de gusanos. A cada ratón se le inoculan 150 huevos. A continuación se subdividen en grupos, conteniendo cada grupo 15 ratones. Cada uno de estos grupos está especificado para ensayar la eficacia de un agente de ensayo como un potencial fármaco terapéutico contra el gusano adulto de *Hymenodepis nana*. Un grupo de control compuesto por 15 ratones también se infecta con el mismo número de huevos, pero no se somete a los agentes de ensayo. La infección se controla y se determina un recuento de huevos de base de las heces para cada ratón (grupos experimental y de control).

### **EJEMPLO 1**

Las siguientes composiciones se ensayaron, cada una, para los efectos antiparasitarios contra *H. nana in vivo*: Rx1 - aceite de comino de comino negro; RX2 - aceite de flor de lila; Rx3 - aceite de tomillo (blanco); Rx4 - carvacrol; RX5 - geraniol; Rx6 - cineol; y Rx7 - aceite de gaulteria; RX8 - aceite de flor de lila-V3; RX9 - trans-anetol; RX10 - *p*-cimeno; Rx11 - timol.

A cada ratón en los grupos experimentales se le inoculó por vía oral 400 mg/kg de peso corporal del compuesto de

- ensayo especificado (Rx) a diario durante 5 días sucesivos comenzando 24 horas después de la detección de huevos en las heces. Al mismo tiempo, a cada ratón del grupo de control se le inocularon por vía oral 400 mg/kg de peso corporal del material de suspensión en solitario, es decir, aceite de soja, a diario durante 5 días sucesivos. Se determinó el recuento de huevos de cada ratón (experimental y de control) diariamente durante los períodos de tratamiento y durante 2 días más después de la última dosis de tratamiento. A los 3 días después de la última dosis del tratamiento, se determinó la tasa de curación. Los criterios para la curación se valoraron de acuerdo con: (1) la determinación de la tasa de reducción de huevos; y (2) la ausencia de los gusanos adultos. El ratón que estaba siendo valorado se sacrificó por decapitación y el intestino delgado se diseccionó para detectar los gusanos adultos.
- 10 Con referencia a la tabla 1 y la figura 1, la tasa de curación varió entre aproximadamente el 30 % y aproximadamente el 70 % después del tratamiento con los compuestos ensayados. Se determinó que un animal infectado estaba curado cuando estaba completamente libre de gusanos y huevos en el momento de la valoración. Diversas composiciones mostraron una tasa de curación significativa, incluyendo: Rx2 (tasa de curación: 71,4 %), RX5 (tasa de curación: 66,6 %), y Rx7 (tasa de curación: 60 %).

15

<b>Tabla 1</b>								
<b>Recuento de huevos (X ± SD)</b>								
<b>Variable</b>	<b>Control</b>	<b>Rx 1</b>	<b>Rx 2</b>	<b>Rx 3</b>	<b>Rx 4</b>	<b>Rx 5</b>	<b>Rx 6</b>	<b>Rx 7</b>
<b>Previamente al tratamiento (datos iniciales)</b>	3 ± 1	2 ± 1	3 ± 1,2	3 ± 1,2	3 ± 1	3 ± 1	3,1 ± 1,2	3 ± 1
<b>Durante el tratamiento</b>								
1º día	3 ± 1	2 ± 1	1 ± 1,2	12 ± 9,1	5 ± 0,6	14 ± 13,9	5 ± 9,5	1,4 ± 1,1
2º día	5 ± 9,5	17,7 ± 45,9	0,8 ± 0,9	26 ± 25,6	2,2 ± 3,4	1,4 ± 2,1	3,8 ± 14,3	10,6 ± 17,9
3º día	31 ± 14	17,5 ± 19	1,8 ± 2,5	66 ± 57,9	1 ± 1,9	4,1 ± 9,6	1 ± 1,2	22,7 ± 39,7
4º día	27 ± 17	33,4 ± 55,7	3,3 ± 3,2	25,4 ± 15,4	0,9 ± 1,2	2,6 ± 7,4	1,8 ± 1,7	9,8 ± 13,2
5º día	5,3 ± 4,7	33,5 ± 25,7	1,7 ± 1,8	5,3 ± 8,9	2 ± 2	2,3 ± 3,6	1,6 ± 1,5	1,6 ± 1,7
<b>Posteriormente al tratamiento</b>								
2 días después de la última dosis	125 ± 42,1	75,8 ± 21,3	2 ± 3,6	17,5 ± 20,3	1,3 ± 1,1	0,5 ± 0,9	2,5 ± 3,5	2,8 ± 5,2
3 días después de la última dosis								
<b>Tasa de positividad (%)</b>	100	66,7	28,6	66,7	71,4	33,4	45,5	40
<b>Tasa de curación (%)</b>	0	33,3	71,4	33,3	28,6	66,6	54,5	60

- La disección posterior al tratamiento de los ratones infectados positivos mostró lo siguiente: los gusanos estaban intactos, vivos y activos; el escólex (cabeza) del gusano estaba intacto manteniendo su característica anatómica con el rostelo móvil y las ventosas contráctiles; el cuello, que se considera la zona de la segmentación (que produce nuevos segmentos), estaba intacta; y el estróbilo (el cuerpo del gusano) estaba intacto, manteniendo su característica anatómica con 3 grupos de segmentos (segmentos inmaduros o segmentos con los órganos reproductores inmaduros, segmentos maduros o segmentos con órganos reproductores maduros, y segmentos grávidos o segmentos con úteros llenos de huevos maduros). Los gusanos estaban ausentes o muertos en los ratones tratados durante 5 días consecutivos con Rx2 (71 %), RX5 (67 %) y Rx7 (60 %).

25

Estos experimentos también pueden llevarse a cabo para estudiar la eficacia del tratamiento de las composiciones proporcionadas en el presente documento contra *Trichuris trichiura in vivo*.

## EJEMPLO 2

30

Los compuestos se combinan para producir las composiciones que tienen propiedades anti-parasitarias divulgadas en el presente documento. Las composiciones ensayadas se exponen en la Tabla 2. Una "X" en una celda de la tabla indica que un compuesto particular está incluido en una composición de ensayo particular. Por ejemplo, en la columna etiquetada "S1", hay una X en la fila que describe el timol. Por tanto, la composición "S1" incluye timol. La

composición S1 incluye además carvacrol, trans-anetol y *p*-cimeno

**TABLA 2**

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	811	S12	S13	S14	S15	S16
timol	X		X		X				X			X	X		X	X
aceite de tomillo (blanco)		X		X		X		X		X	X			X		
linalol																X
carvacrol	X	X	X	X	X											
trans-anetol	X	X	X	X			X									X
$\alpha$ -pineno																X
<i>p</i> -cimeno	X	X														X
aceite de comino negro								X		X		X				
aceite de flor de lila									X		X		X			
geraniol								X	X			X	X			
aceite de gaulteria														X	X	
cineol														X	X	
aceite de lima								X		X	X					
d-limoneno									X							

5

A cada ratón en los grupos experimentales se le inocularon por vía oral 400 mg/kg de peso corporal de la composición de ensayo especificada a diario durante 5 días sucesivos. Al mismo tiempo, a cada ratón del grupo de control se le inoculan por vía oral 400 mg/kg de peso corporal a diario durante 5 días sucesivos del material de suspensión en solitario, es decir, aceite de soja. Se determinó el recuento de huevos de cada ratón (experimental y de control) diariamente durante los períodos de tratamiento y durante 2 días más después de la última dosis de tratamiento. A los 3 días después de la última dosis del tratamiento, se determina la tasa de curación. Los criterios para la curación se valoran de acuerdo con: (1) la determinación de la tasa de reducción de huevos; y (2) la ausencia de gusanos adultos. El ratón que estaba siendo valorado se sacrifica por decapitación y el intestino delgado se disecciona para detectar los gusanos adultos.

15

Se espera que la tasa de curación esté entre aproximadamente el 25 % y el 80 % después del tratamiento con las composiciones S1 a S16. Se determina que un animal infectado está curado cuando está completamente libre de gusanos y huevos en el momento de la valoración. Los gusanos están ausentes o muertos en ratones tratados durante varios días consecutivos con las composiciones que tienen tasas de curación de aproximadamente el 60 % o superiores.

20

Estos experimentos también pueden llevarse a cabo para estudiar la eficacia del tratamiento de las composiciones proporcionadas en el presente documento contra *Trichuris trichiura in vivo*.

### 25 EJEMPLO 3

Las siguientes composiciones y composiciones de mezcla se ensayaron, cada una, para los efectos antiparasitarios contra *H. nana in vivo*: (1) *p*-cimeno; (2) timol; (3)  $\alpha$ -pineno; (4) linalol; (5) aceite de soja (control); y (6) mezcla del 30 % de *p*-cimeno, el 35 % de timol, el 4 % de  $\alpha$ -pineno, el 7 % de linalol, y el 24 % de aceite de soja, donde los porcentajes son en peso.

30

A cada ratón en los grupos experimentales se le inocularon por vía oral 100 mg/kg de peso corporal de la composición o composición de mezcla especificada a diario durante 5 días sucesivos. Se determinó el recuento de huevos de cada ratón (experimental y de control) diariamente durante los períodos de tratamiento y durante 2 días más después de la última dosis de tratamiento. Después del 3º día desde de la última dosis del tratamiento, se determinó la tasa de curación. Los criterios para la curación se valoraron de acuerdo con: (1) la determinación de la tasa de reducción de huevos; y (2) la ausencia de los gusanos adultos. El ratón que estaba siendo valorado se sacrificó por decapitación y el intestino delgado se diseccionó para detectar los gusanos adultos.

35

Con referencia a la tabla 3, la tasa de curación variaba entre el 0 %, para el aceite de soja (control), y el 100 %, para la composición de mezcla que contenía el 30 % de *p*-cimeno, el 35 % de timol, el 4 % de  $\alpha$ -pineno, el 7 % de linalol y el 24 % de aceite de soja. La tasa de curación representa el número de animales infectados que no demuestran huevos en las heces y tampoco se encuentran gusanos en el intestino después del tratamiento con los compuestos 5 ensayados.

TABLA 3

Grupo	Compuesto	Dosis ensayada (mg/kg p.c.)	Tasa de curación (%)
1	<i>p</i> -cimeno	100	13,3
2	timol	100	33,3
3	$\alpha$ -pineno	100	25,0
4	linalol	100	23,3
5	aceite de soja (control)	100	00,0
6	composición de mezcla*	100	100

\*30 % de *p*-cimeno, 35 % de timol, 4 % de  $\alpha$ -pineno, 7 % de linalol y 24 % de aceite de soja

Tal como se indica mediante los datos anteriores, la composición de mezcla tiene un efecto sinérgico, en 10 comparación con los compuestos individuales que son componentes de la mezcla. Se puede calcular un coeficiente de sinergia para la mezcla, en relación con cada compuesto individual, es decir, composición de comparación. Dichos coeficientes de sinergia se exponen en la tabla 4.

TABLA 4

Composición de comparación	Tasa de curación (%)	Relación de actividad	Concentración de composición de comparación en la mezcla (% en peso)	Factor de ajuste de la concentración	Coefficiente de sinergia
<i>p</i> -cimeno	13,3	$(1,00)/(0,133)=7,52$	30	$(1,00)/(0,300)=3,33$	25,1
timol	33,3	$(1,00)/(0,333)=3,00$	35	$(1,00)/(0,350)=2,86$	8,57
$\alpha$ -pineno	25,0	$(1,00)/(0,250)=4,00$	4	$(1,00)/(0,040)=25,0$	100
linalol	23,3	$(1,00)/(0,233)=4,29$	7	$(1,00)/(0,070)=14,29$	61,3
aceite de soja (control)	00,0	---	24	$(1,00)/(0,240)=4,17$	---
mezcla	100	$(1,00)/(1,00)=1,00$	100	$(1,00)/(1,00)=1,00$	1,00

15

Por ejemplo, la relación de actividad para *p*-cimeno es 7,52 dado que el efecto de la mezcla es una tasa de curación del 100 %, mientras que el efecto de *p*-cimeno solo es un 13,3 %  $[(1,00)/(0,133)=7,52]$ . El factor de ajuste de la concentración para *p*-cimeno es 3,33 dado que la mezcla contiene el 30 % de *p*-cimeno, en comparación con el 100 % de *p*-cimeno ensayado solo  $[(1,00)/(0,300)=3,33]$ . El coeficiente de sinergia de la mezcla, con respecto a *p*-cimeno 20 ( $S_{p\text{-cimeno}}$ ) es, por lo tanto, 25,1  $[(1,00)/(0,133)]/(0,300)=25,1$ . Con referencia adicional a la tabla 4, los coeficientes de sinergia para la mezcla son los siguientes:  $S_{p\text{-cimeno}} = 25,1$ ;  $S_{\text{timol}} = 8,57$ ;  $S_{\alpha\text{-pineno}} = 100$ ; y  $S_{\text{linalol}} = 61,3$ .

#### EJEMPLO 4

25 En el presente ejemplo, *Schistosoma mansoni* se selecciona como un parásito ejemplar usado para estudiar la eficacia *in vivo* de composiciones divulgadas en el presente documento para tratar infecciones parasitarias. La valoración de la eficacia de las composiciones ensayadas contra infección por *S. mansoni* es con respecto a la carga de gusanos, la relación de sexo de los gusanos, la distribución de los gusanos, fecundidad de gusanos hembra y puesta de huevos en el hígado y el intestino.

30

Ratones suizos albinos, de 8 semanas de edad, de 18-22 g de peso, que pueden obtenerse del Theodore Bilharz Research Institute, El Cairo, son infectados por vía percutánea por cercarias de *S. mansoni* (100 cercarias/ratón), cada grupo consiste en 15 ratones.

Para cada composición de ensayo, se ensayan tres concentraciones. Para cada concentración, se estudian nueve grupos de ratones. Un grupo de ratones infectados por *S. mansoni* recibe Praziquantel (PZQ), que es el fármaco antiesquistosómico estándar actual. Tres grupos de ratones no infectados reciben el compuesto de ensayo en el mismo programa y a la misma concentración que los grupos de fármacos de ensayo. Un grupo de ratones no infectados y no tratados y un grupo de ratones infectados por *S. mansoni* que no reciben ningún tratamiento se mantienen como controles.

Se determinan tres concentraciones diferentes de cada una de las composiciones de ensayo después de la estimación de la DL<sub>50</sub>. El programa para administración de fármacos es el siguiente: (1) cuatro días post-infección (PI); (2) una semana PI; y siete semanas PI. Praziquantel (Distocida), 600 mg/kg de peso corporal, se administra siete semanas PI. Todos los fármacos se administran por vía oral usando un tubo estomacal.

Para los estudios parasitológicos, se llevan a cabo recuentos de huevos fecales para todos los grupos infectados dos veces por semana a partir de la 5ª semana PI.

Los ratones se sacrifican 9 semanas PI. Se realiza perfusión del sistema portal para la recuperación de los gusanos esquistosomas. Se determinan el número total, el sexo, la maduración y la distribución de los gusanos. Cuatro porciones, dos del yeyuno y dos del íleon, se toman de cada ratón, se lavan con PBS, se abren y se comprimen entre dos portaobjetos y se examinan microscópicamente para la detección de la fase de maduración. 0,3 gramos del hígado y del intestino se digieren en hidróxido de potasio al 4 % durante la noche, y se cuentan los huevos de *S. mansoni*.

#### EJEMPLO 5

Tres grupos de ratones se tratan con cada compuesto de ensayo o composición de mezcla de compuestos. Para los grupos 1 y 2, el tratamiento comienza 4 y 7 días después de la infección, respectivamente. Para el grupo 3, el tratamiento comienza 7 semanas después de la infección. Para el grupo control, a los ratones se les inyecta 7 semanas después de la infección Praziquantel a 600 mg/kg. La eficacia de los agentes de ensayo se determina basándose en: la carga de gusanos; la relación de sexos; la distribución de los gusanos; la fecundidad de gusanos hembra; y la puesta de huevos en el hígado y el intestino.

#### EJEMPLO 6

Se recogieron *S. mansoni* macho y hembra adultos de ratones infectados y se transfirieron a 100 ml de solución salina tratada con composiciones de ensayo Rx1-Rx10 (tal como se divulga en el ejemplo 1) o Praziquantel a concentraciones variables y se incubaron a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5 %. En muchos casos los machos y hembras adultos se recogen como parejas. La viabilidad de los gusanos se examina en un microscopio binuclear. Los controles se tratan en paralelo. El experimento se termina bien cuando todos los gusanos están muertos en las muestras tratadas o cuando se descubre la primera muerte entre los controles.

Cada uno de los compuestos se ensayaron individualmente a concentraciones diferentes y los datos de estos experimentos se presentan en la figura 2. A continuación, cada compuesto se ensayó por sí mismo a 100 ppm de concentración final y luego se combinaron composiciones a relaciones 1:1 cuando se combinaron dos compuestos o relaciones 1:1:1 cuando se combinaron tres compuestos y cada composición combinada se ensayó a 100 ppm de concentración final. Los datos de estos experimentos se presentan en la figura 3.

#### EJEMPLO 7

El presente ejemplo proporciona un estudio *in vitro* que ensaya el tratamiento de *Histomonas meleagridis* un parásito protozoo que causa histomoniasis de pollos y pavos, usando los compuestos divulgados en el presente documento y composiciones de mezcla de los compuestos.

*H. meleagridis* se cultiva *in vitro* y se prepara para uso en viales de vidrio con tapón de rosca que contenían 1 ml de medio de Dwyer y se inoculan con 20.000 células. Los compuestos y/o composiciones de ensayo se diluyen a concentraciones apropiadas, de modo que la dosis deseada se administre a los tubos en 0,1 ml. Cada tratamiento se replica en cultivos por duplicado. Los cultivos se incuban durante 2 días.

El número de células de *H. meleagridis*/ml puede contarse usando un hemocitómetro estándar (Neubauer) y el número real de células/ml se notifica.

Cada compuesto y/o composición se ensaya al 1, 0,1, 0,01, 0,001 y 0,0001 %. Se incluyen controles como no tratados y con disolvente (etanol). Los datos de estos experimentos se presentan en las figuras 4 y 5.

**EJEMPLO 8**

5

*Trichuris trichiura* es una infección por nematodo común en el mundo. La prevalencia más alta se produce en climas tropicales con malas prácticas de saneamiento, dado que presenta transmisión fecal/oral.

10 *Trichuris trichiura* no migra a través de los tejidos, y no causa eosinofilia. Puede sobrevivir 6 años en un huésped (3 años de promedio), viviendo en el intestino grueso con su cabeza embebida en la mucosa intestinal, pero virtualmente no hay ninguna respuesta celular. El diagnóstico de *Trichuris trichiura* se realiza a través del descubrimiento de los huevos en las heces.

15 La infección con *Trichuris trichiura* frecuentemente es asintomática. Sin embargo, en infección fuerte en niños malnutridos, *Trichuris trichiura* puede causar prolapso rectal después de diarrea sanguinolenta crónica.

20 Pueden ensayarse compuestos y composiciones mezcladas de los compuestos, tal como se divulgan en el presente documento, para actividad anti-parasitaria *in vitro* usando los siguientes protocolos. Pueden ensayarse diez grupos (8 concentraciones diferentes de composiciones y 2 controles). Se realizan ensayos en placas de seis pocillos estériles con 1-4 gusanos por pocillo. Cada pocillo contiene 3 ml de RPMI 1640 que contiene una solución 10X antibiótica/antimicótica (penicilina/estreptomocina/anfotericina B) para prevenir la proliferación de organismos contaminantes. La motilidad de los gusanos se observa en todos los puntos temporales iniciales, así como 24 horas después del tratamiento, es decir después de lavado y colocación en medios sin compuestos de ensayo.

25 Tal como se indica, se ensayan ocho concentraciones y dos controles. Los controles indicados para estos ensayos serán un control tensioactivo y un control de medios. El protocolo utiliza 5 - 10X de las concentraciones finales de compuestos de ensayo a añadir a los medios en el momento del ensayo.

30 Una vez que el ensayo se ha iniciado, la motilidad se comprueba a los 15, 30, 60, 120, 240 y 360 minutos después del tratamiento. Después del último punto temporal, los gusanos se retiran de los medios tratados, se aclaran y se colocan en medios no tratados. Se realiza una última comprobación de motilidad 24 después del tratamiento. Los gusanos en los que no se observaba motilidad son pinchados con una varilla aplicadora de madera estéril (autoclavada) para confirmar la falta de sensibilidad.

**35 EJEMPLO 9**

Pueden ensayarse compuestos y composiciones mezcladas de los compuestos, tal como se divulgan en el presente documento, para actividad anti-parasitaria *in vitro* usando los siguientes protocolos. Pueden ensayarse diez grupos (8 concentraciones diferentes de composiciones y 2 controles). Se realizan ensayos en matraces de 150 cm<sup>3</sup> estériles con 1-2 gusanos por matraz. Cada matraz contiene 200 ml de RPMI 1640 que contiene una solución 10X antibiótica/antimicótica (penicilina/estreptomocina/anfotericina B) para prevenir la proliferación de organismos contaminantes. La motilidad de los gusanos se observa en todos los puntos temporales iniciales, así como 24 horas después del tratamiento, es decir después de lavado y colocación en medios sin compuestos de ensayo.

45 Tal como se indica, se ensayan ocho concentraciones y dos controles. Los controles indicados para estos ensayos serán un control tensioactivo y un control de medios. El protocolo utiliza 5 - 10X de las concentraciones finales de compuestos de ensayo a añadir a los medios en el momento del ensayo.

50 Una vez que el ensayo se ha iniciado, la motilidad se comprueba a los 15, 30, 60, 120, 240 y 360 minutos después del tratamiento. Después del último punto temporal, los gusanos se retiran de los medios tratados, se aclaran y se colocan en medios no tratados. Se realiza una última comprobación de motilidad 24 después del tratamiento. Los gusanos en los que no se observaba motilidad son pinchados con una varilla aplicadora de madera estéril (autoclavada) para confirmar la falta de sensibilidad.

**55 EJEMPLO 10**

Se usa una composición de ensayo ejemplar, que comprende: 7 % (vol/vol) de linalol; 35 % (vol/vol) de timol; 4 % (vol/vol) de alfa-pineno; 30 % (vol/vol) de p-cimeno; y 24 % (vol/vol) de aceite de soja. Las dosis de ensayo son: 1 mg / kg de peso corporal (PC), 10 mg/kg PC, 20 mg/kg PC, son 100 mg/kg de PC.

60

Los criterios de curación usados para los experimentos son: (1) tiempo de exposición y nivel de dosis eficaz para producir un 100 % de destrucción de *H. nana* en un mínimo del 80 % de ratones infectados (por ejemplo, curación = 0 gusanos viables en el intestino y 0 huevos viables en las heces). El corto ciclo de vida de *H. nana* puede facilitar un rápido ensayo profiláctico. *H. nana* presenta un ciclo de vida de aproximadamente 14 días desde la infección del 5 huevo hasta la maduración y la puesta de huevos.

Se implementan varios protocolos de administración para ensayar la eficacia de la composición ejemplar contra la infección. En un primer protocolo, se administra una dosis oral a 5 grupos de ratones a través de una cápsula de gel 3 días antes de la infección y a diario hasta que los ratones son sacrificados. En un segundo protocolo, se administra 10 una dosis oral a 5 grupos de ratones a través de una cápsula de gel 3 semanas antes de la infección y a diario hasta que los ratones son sacrificados. En un tercer protocolo, se administra una dosis oral a 5 grupos de ratones a través de una cápsula de gel a diario comenzando 3 semanas antes de la infección y el tratamiento se interrumpe después de la infección hasta que los ratones son sacrificados. Los grupos de control de ratones en cada uno de los protocolos reciben dosis de aceite de soja solamente. Datos de los tres protocolos que usan diferentes mg/kg PC de 15 la composición de ensayo ejemplar se presentan en las tablas 5-8.

**TABLA 5**

Dosis ensayada	Número total de animales	Número de animales que portan gusanos		% de Curación
		Positivos	Negativos	
Control Infectado solamente	25	13 (52 %)	12	64,0 %
20 mg/kg 3 semanas interrumpido	25	9	16	
Control Infectado solamente	25	18 (72 %)	7	76,0 %
20 mg/kg 3 semanas continuado	25	6	19	
Control Infectado solamente	24	18 (75 %)	6	87,8 %
20 mg/kg 3 días continuado	41	5	36	

**TABLA 6**

	% de reducción de la producción de huevos en las heces a día 14	% de reducción del recuento de huevos/gusano
Control Infectado solamente	0,0 %	ND
20 mg/kg 3 semanas interrumpido	76,39 %	ND
Control Infectado solamente	0,0 %	0,0 %
20 mg/kg 3 semanas continuado	93,59 %	(77,85 %)
Control Infectado solamente	0,0 %	0,0 %
20 mg/kg 3 días continuado	68,44 %	(40,58 %)

20

**TABLA 7**

Grupos	% de reducción de la producción de huevos en las heces	
	Día 10	Día 14
Control Infectado solamente	0,0 %	0,0 %
10 mg/kg 3 días continuado	0,0 %	0,0 %
Control*	0,0 %	0,0 %
10 mg/kg 3 semanas continuado	100 %	79 %
10 mg/kg 3 semanas interrumpido	85 %	43 %

**TABLA 8**

<u>Grupos</u>	<u>% de curación</u>	<u>% de reducción del recuento de huevos/gusano</u>
<b>Control Infectado solamente</b>	<b>0,0 %</b>	<b>ND</b>
<b>10 mg/kg 3 días</b>	<b>52,0 %</b>	<b>ND</b>
<b>continuado Control</b>	<b>0,0 %</b>	<b>0,0 %</b>
<b>10 mg/kg 3 semanas continuado</b>	<b>91,3 %</b>	<b>95 %</b>
<b>10 mg/kg 3 semanas interrumpido</b>	<b>80 %</b>	<b>91 %</b>

**TABLA 9**

Tratamiento	N	Estado de infección		% de reducción de la producción de huevos/g de heces/ratón		Número de gusano/ratón	% de reducción de huevos/gusano	% de tasa de curación
		+vo	-vo	día 10 postinfección	día 14 postinfección			
Control	23	12	11			5,72 ± 12		
10 mg/kg 3 semanas continuado	23	2	21	100 %**	79 %	0,4 ± 2,3	95 %	91,3 %*
Control Infectado solamente	24	18	6			9,75 ± 28,2		
20 mg/kg 3 días continuado	41	5	36	ND	68,4	0,07 ± 0,35	40,6 %	87,8 %*

5

**EJEMPLO 11**

Se usa una composición de ensayo ejemplar, que comprende: 7 % (vol/vol) de linalol; 35 % (vol/vol) de timol; 4 % (vol/vol) de alfa-pineno; 30 % (vol/vol) de p-cimeno; y 24 % (vol/vol) de aceite de soja.

10

Se proporcionan grupos de ensayo de ratones para la infección y el tratamiento, que contienen cada uno aproximadamente 20 ratones (por ejemplo, 5 grupos de ensayo x 20 ratones por grupo de ensayo = 100 ratones). Los animales son seleccionados y examinados para asegurarse de que están libres de gusanos. Los siguientes grupos de ensayo se designan para ser infectados y para recibir el siguiente tratamiento:

15

- Grupo 1: vehículo aceite de soja solamente;
- Grupo 2: 1 mg/kg de peso corporal (PC) de composición;
- Grupo 3: 10 mg/kg PC de composición;
- Grupo 4: 20 mg/kg PC de composición; y

20

Grupo 5: 100 mg/kg PC de composición.

Se puede proporcionar un grupo de control adicional que no está infectado y administrársele la composición ejemplar.

25

Se infectan grupos de ratones designados para infección. Se determina que aproximadamente 150 huevos viables por ratón son útiles para infectar ratones de modo que la exposición de los animales de ensayo a la fase infecciosa del parásito es predictiva de la exposición ambiental realista.

30

Una dosis oral se administra a través de una cápsula de gel a los grupos de ensayo de ratones 2 días después de que se observó propagación de huevos. La dosis oral se administra diariamente hasta que los ratones son sacrificados. La semivida de dosis de composición ejemplar puede determinarse en la sangre de mamíferos para guiar la especificación de regímenes profilácticos y terapéuticos.

**EJEMPLO 12**

35

Se llevan a cabo estudios de resistencia de composiciones ejemplares. Se usa una composición de ensayo ejemplar, que comprende: 7 % (vol/vol) de linalol; 35 % (vol/vol) de timol; 4 % (vol/vol) de alfa-pineno; 30 % (vol/vol) de p-cimeno; y 24 % (vol/vol) de aceite de soja.

5 Se proporcionan grupos de ensayo de ratones, que contienen cada uno aproximadamente 20 ratones (por ejemplo, 5 grupos de ensayo x 20 ratones por grupo de ensayo = 100 ratones). Los animales son seleccionados y examinados para asegurarse de que están libres de gusanos. Los siguientes grupos de ensayo se designan para ser infectados y para recibir el siguiente tratamiento:

- 10 Grupo 1: vehículo aceite de soja solamente;  
 Grupo 2: 1 mg/kg de peso corporal (PC) de composición;  
 Grupo 3: 10 mg/kg PC de composición;  
 Grupo 4: 20 mg/kg PC de composición; y  
 Grupo 5: 100 mg/kg PC de composición.

15 Se puede proporcionar un grupo de control adicional que no está infectado y administrársele la composición ejemplar.

20 Se infectan grupos de ratones designados para infección. Se determina que aproximadamente 150 huevos viables por ratón son útiles para infectar ratones de modo que la exposición de los animales de ensayo a la fase infecciosa del parásito es predictiva de la exposición ambiental realista. El ADN diana de los huevos usados para la infección inicial se secuencian antes del tratamiento con composiciones ejemplares, para uso como una secuencia de control.

25 Una dosis oral se administra a través de una cápsula de gel a los grupos de ensayo de ratones 2 días después de que se observó propagación de huevos. La dosis oral se administra diariamente hasta que los ratones son sacrificados. Los huevos viables se cuentan y se recogen. Los huevos viables recogidos se usan para volver a infectar el grupo de ensayo de animales previamente no infectados, que se tratan a continuación con la composición ejemplar como anteriormente. La etapa se repite, para un total de tres recuentos y recogidas de huevos viables. Tras el tercer recuento y recogida de huevos viables, se secuencian el ADN diana de huevos viables.

30 Se supone que el parásito ha pasado por tres ciclos reproductivos. La secuencia de ADN no expuesto de control puede compararse con la secuencia de ADN diana obtenido a partir de huevos después del tercer ciclo, que tiene tres exposiciones sucesivas a las composiciones de tratamiento ejemplares. La resistencia se determina considerando: ningún cambio en la secuencia de ADN diana expuesto frente a la secuencia de ADN diana de control  
 35 da como resultado uno o más cambios de aminoácidos.

### EJEMPLO 13

40 Se llevan a cabo estudios de seguridad de composiciones ejemplares. Los estudios de seguridad incluyen ensayos de toxicidad aguda (de búsqueda del intervalo), estudios de toxicología genética in vitro, y estudio de toxicidad subcrónica para roedores (90 días) realizados de conformidad con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

45 Los animales son expuestos a dosis diarias de las composiciones terapéuticas que están siendo ensayadas. Por ejemplo, puede usarse una composición de ensayo ejemplar, que comprende: 7 % (vol/vol) de linalol; 35 % (vol/vol) de timol; 4 % (vol/vol) de alfa-pineno; 30 % (vol/vol) de p-cimeno; y 24 % (vol/vol) de aceite de soja. Los siguientes grupos de ensayo se designan para recibir el siguiente tratamiento:

- 50 Grupo 1: vehículo aceite de soja solamente;  
 Grupo 2: 0,07 g/kg de peso corporal (PC) por día;  
 Grupo 3: 0,7 g/kg PC por día; y  
 Grupo 4: 7g/kg PC por día.

55 Se realizan todos los ensayos observacionales y clínicos apropiados (incluyendo histopatología) para valorar cualesquiera efectos relacionados con el tratamiento. Las mediciones de seguridad (véase la tabla 10) se realizan a 100X la dosis eficaz usando un protocolo de eficacia profiláctica. Por ejemplo, si la dosis eficaz es 10 mg/kg, la dosis de ensayo de seguridad es 1 g/kg.

60

TABLA 10

Mediciones de seguridad	Tamaño de muestra (nº de ratones)	Medición clave
cambios de peso corporal	20-40	menos del 11 % de cambio de peso corporal, ensayo frente a control
cambios en la ingesta de agua	20-40	menos del 11 % de diferencial, ensayo frente a control
cambios en la ingesta de alimento	20-40	menos del 11 % de diferencial, ensayo frente a control
recuento de glóbulos rojos	20-40	ninguna diferencia significativa frente a control o dentro de un intervalo normal
recuento de glóbulos blancos	20-40	ninguna diferencia significativa frente a control o dentro de un intervalo normal
hemoglobina	20-40	ninguna diferencia significativa frente a control o dentro de un intervalo normal
sGOT (función hepática)	20-40	ninguna diferencia significativa frente a control o dentro de un intervalo normal
sGPT (función hepática)	20-40	ninguna diferencia significativa frente a control o dentro de un intervalo normal
creatinina	20-40	ninguna diferencia significativa frente a control o dentro de un intervalo normal
consistencia de la materia fecal	20-40	ninguna diferencia significativa frente a control o dentro de un intervalo normal

El sabor agradable relativo de composiciones ejemplares también se ensaya. Pueden diseñarse combinaciones 5 sinérgicas de compuestos para favorecer compuestos con sabor agradable preferido

#### EJEMPLO 14

Un gen receptor que codifica el receptor de tiramina (TyrR) ha sido aislado de la cucaracha americana, la mosca de 10 la fruta, mosquitos y otros organismos. Se describen procedimientos de utilización de la proteína TyrR expresada en células para cribar compuestos útiles para tratar infecciones parasitarias.

En el presente ejemplo, los genes que codifican TyrR se incorporaron en células modelo en cultivo que imitan los 15 receptores en los insectos. El proceso de selección usa las células cultivadas en combinación con ensayos de medición de  $[Ca^{2+}]_i$  y  $[AMPc]_i$  para determinar cuantitativamente la eficacia del compuesto de ensayo para tratar infecciones parasitarias. El proceso de cribado permite la identificación de compuestos que producen composiciones antiparasitarias altamente eficaces.

Las etapas del ensayo son las siguientes. Una célula que expresa un receptor de tiramina se pone en contacto con 20 un compuesto de ensayo y se mide la afinidad de unión al receptor del compuesto de ensayo. Los niveles de AMPc y/o  $Ca^{2+}$  dentro de la célula también se monitorizan y cualquier cambio resultante de la puesta en contacto del compuesto de ensayo con la célula se indica para cada compuesto ensayado. Un compuesto de ensayo se identifica como un compuesto terapéutico potencial si exhibe una alta afinidad de unión al receptor por el receptor de tiramina, así como una capacidad de efectuar el cambio en los niveles de AMPc y/o  $Ca^{2+}$  dentro de la célula. Un compuesto 25 de ensayo también se identifica como un compuesto terapéutico potencial si exhibe una baja afinidad de unión al receptor por el receptor de tiramina, así como una capacidad de efectuar el cambio en los niveles de AMPc y/o  $Ca^{2+}$  dentro de la célula. A continuación puede seleccionarse una composición para uso en el tratamiento de una formulación parasitaria, que incluye una pluralidad de los compuestos identificados. En particular, la composición puede comprender al menos un compuesto identificado como que tiene una alta afinidad de unión al receptor por el 30 receptor de tiramina, así como una capacidad de efectuar el cambio en los niveles de AMPc y/o  $Ca^{2+}$  niveles dentro de la célula y al menos un compuesto adicional identificados como que tiene una baja afinidad de unión al receptor por el receptor de tiramina, así como una capacidad de efectuar el cambio en los niveles de AMPc y/o  $Ca^{2+}$  dentro de la célula.

35 La tabla 11 enumera los compuestos ensayados con el presente procedimiento de cribado y la capacidad determinada de cada compuesto de unirse al receptor de tiramina, producir  $Ca^{2+}$  intracelular producir AMPc intracelular. Estos resultados pueden ser utilizados a continuación para seleccionar una composición que comprende

dos o más de los compuestos ensayados con características deseables. Por ejemplo, p-cimeno y linalol pueden ser seleccionados para incluirlos en una composición para el tratamiento de infecciones parasitarias de acuerdo con los criterios del procedimiento de cribado dado que p-cimeno exhibe baja afinidad de unión al receptor de tiramina, el linalol exhibe alta afinidad de unión al receptor de tiramina, y ambos compuestos producen el cambio en los niveles de AMPc y/o Ca<sup>2+</sup>. Del mismo modo, p-cimeno y timol pueden ser seleccionados para incluirlos en una composición para el tratamiento de infecciones parasitarias de acuerdo con los criterios del procedimiento de cribado dado que p-cimeno exhibe baja afinidad de unión al receptor de tiramina, el timol exhibe alta afinidad de unión al receptor de tiramina, y ambos compuestos producen el cambio en los niveles de AMPc y/o Ca<sup>2+</sup>. Además, pueden formularse composiciones para el tratamiento de infecciones parasitarias que incluyen más de dos compuestos, tal como por ejemplo una composición que incluye alfa-pineno, p-cimeno, linalol, timol y aceite de soja. Puede ser preferible formular una composición que muestra un efecto anti-parasitario superior al efecto anti-parasitario de cualquiera de los compuestos cuando se usan solos.

TABLA 11

Compuesto	Afinidad de unión al receptor de tiramina (Alta o baja)	Produce Ca <sup>2+</sup> intracelular (Sí o no)	Produce AMPc intracelular (Sí o no)
<b>alfa-pineno</b>	Baja	No	No
anetol	Baja	Sí	Sí
alcohol bencílico	Baja	No	Sí
aceite de comino negro	Alta	Sí	Sí
aceite de cedro	Baja	Sí	Sí
cineol	Baja	Sí	Sí
aceite de canela	Baja	No	No
alcohol cinnamílico	Baja	Sí	No
aceite de citronela	Baja	No	Sí
aceite de clavo	Baja	Sí	Sí
<b>p-cimeno</b>	Baja	Sí	Sí
d-limoneno	Alta	Sí	Sí
Eugenol	Baja	Sí	No
aceite de ajo	Baja	Sí	Sí
aceite de limón	Baja	No	No
aceite de citronela	Baja	No	No
aceite de flor de lila	Alta	Sí	Sí
aceite de lima	Baja	Sí	Sí
d-limoneno	Baja	Sí	No
<b>linalol</b>	Alta	Sí	No
aceite de linaza	Baja	No	No
aceite de poleo	Baja	Sí	Sí
aceite de naranja dulce	Baja	Sí	No
aceite de menta	Baja	No	Sí
propionato de fenetilo	Baja	No	Sí
aceite de pino	Baja	No	No
aceite de romero	Baja	No	No
lauril sulfato sódico	Baja	No	No
<b>aceite de soja</b>	Baja	No	No
aceite de tomillo	Alta	Sí	Sí
<b>timol</b>	Alta	Sí	No
vanillina	Baja	Sí	No
aceite mineral blanco	Baja	Sí	Sí
geraniol	Alta	Sí	Sí
tetrahidrolinalol	Alta	Sí	Sí

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición para uso en el tratamiento o la prevención de una infección parasitaria en un sujeto mamífero, que comprende para-cimeno, linalol, alfa-pineno, timol y aceite de soja, donde la concentración de para-cimeno está entre el 25 y el 35 %, la concentración de linalol está entre el 1 y el 10 %, la concentración de alfa-pineno está entre el 1 y el 10 %, la concentración de timol está entre el 35 y el 45 %, y la concentración de aceite de soja está entre el 20 y el 30 % en peso, donde la composición demuestra un efecto anti-parasitario que supera el de cualquiera de sus componentes.
- 5 2. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la infección parasitaria es por un parásito seleccionado de entre: un protozoo, un nematodo, un trematodo o un cestodo.
3. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde el parásito se selecciona de entre:  
15 Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, Cryptosporidium muris, Trypanosomatida gambiense, Trypanosomatida rhodesiense, Trypanosomatida cruzi, Leishmania mexicana, Leishmania braziliensis, Leishmania tropica, Leishmania donovani, Toxoplasma gondii, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae, Plasmodium falciparum, Trichomonas vaginalis, Histomonas meleagridis, Trichuris trichiura, Ascaris lumbricoides, Enterobius vermicularis, Ancylostoma duodenale, Necator americanus, Strongyloides stercoralis, Wuchereria bancrofti, Dracunculus medinensis, Schistosoma mansoni, Schistosoma haematobium, Schistosoma japonicum, Fasciola hepatica, Fasciola  
20 gigantica, Heterophyes heterophyes, Paragonimus westermani, Taenia solium, Taenia saginata, Hymenolepis nana y Echinococcus granulosus.
4. La composición para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3 y un vehículo acuoso u oleoso.  
25
5. La composición para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4 y un vehículo de producto alimentario.
6. La composición para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-5 encapsulada o  
30 microencapsulada con un material de envuelta externa.
7. Uso de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una infección parasitaria.

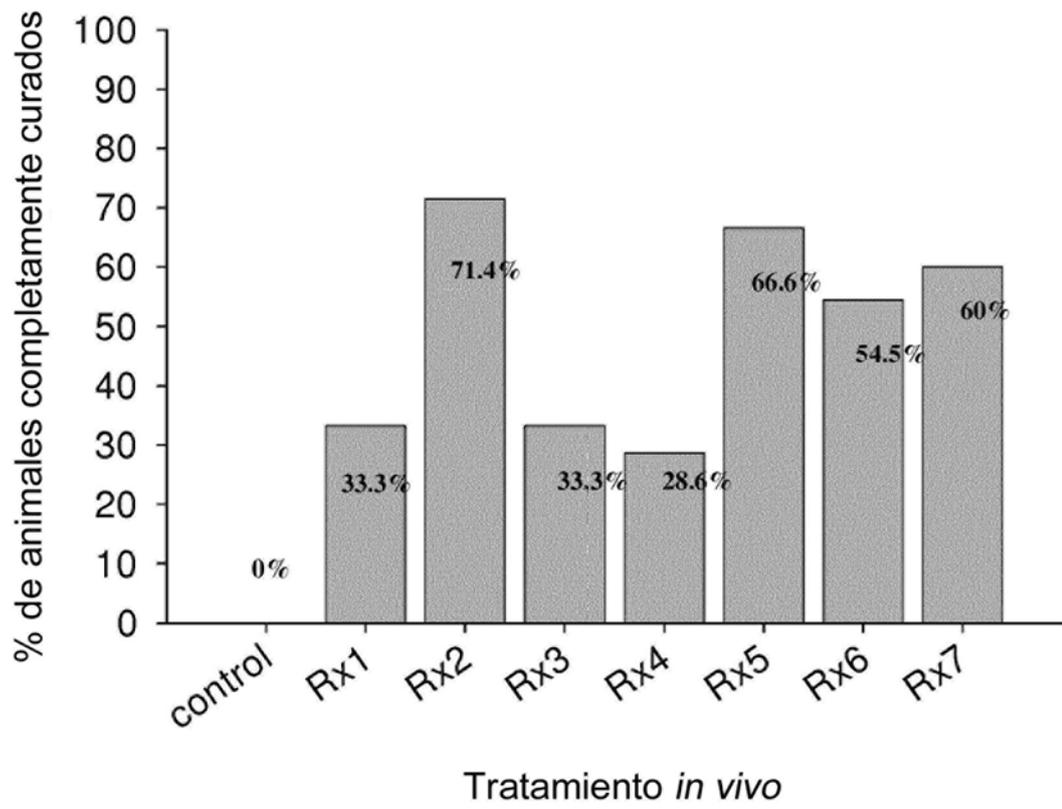


FIGURA 1

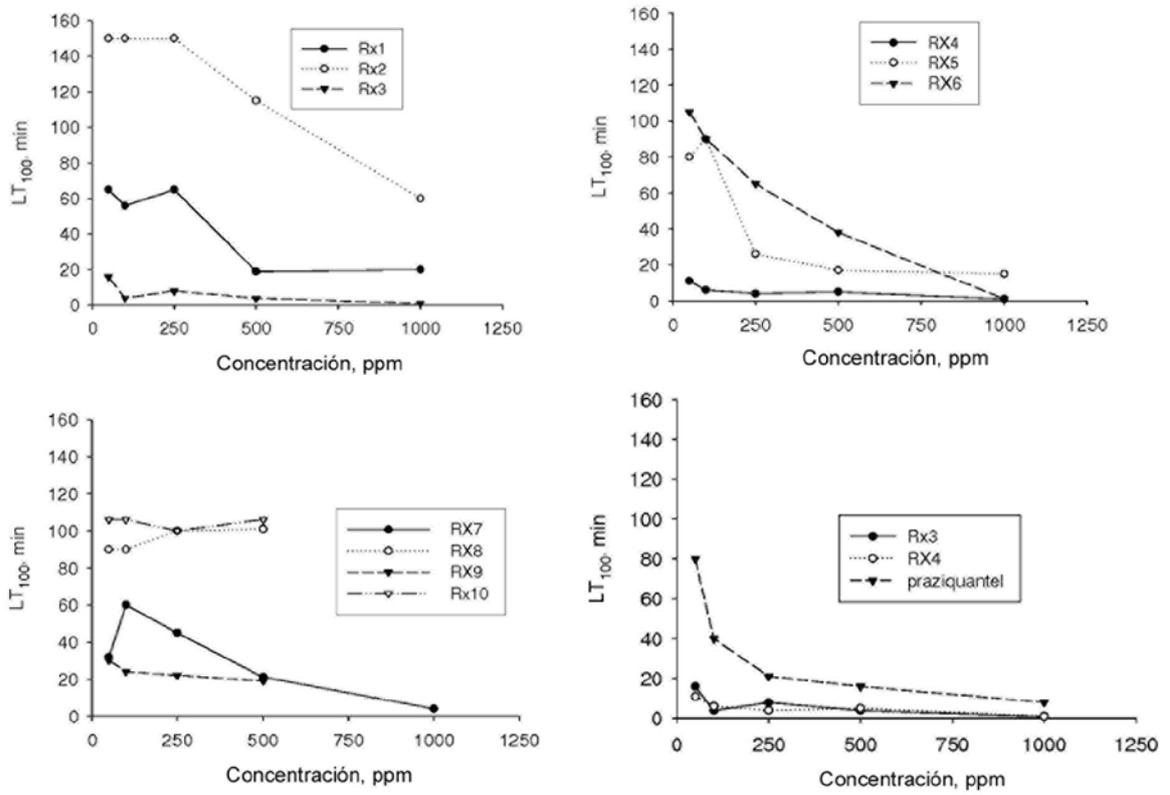


FIGURA 2

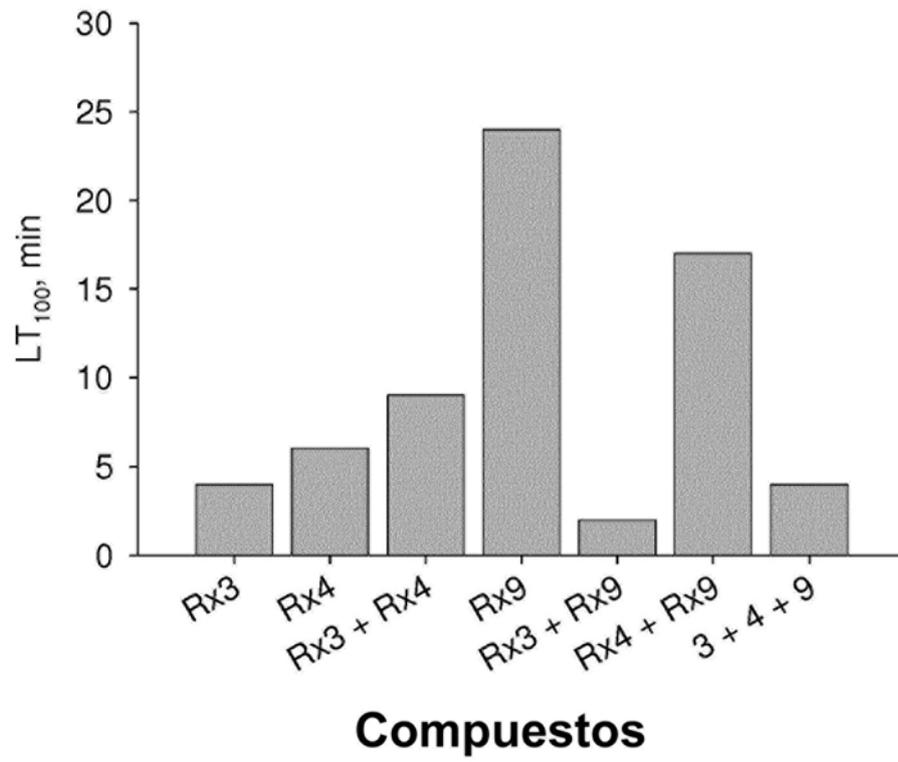


FIGURA 3

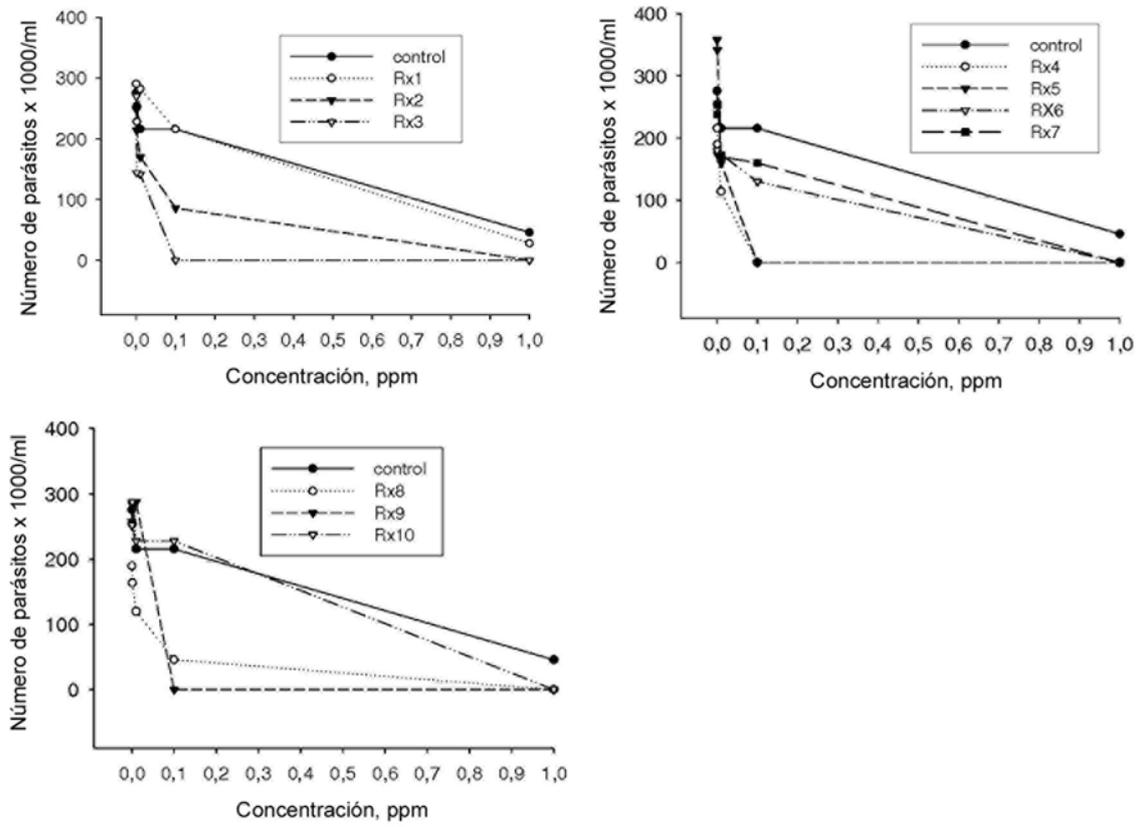


FIGURA 4

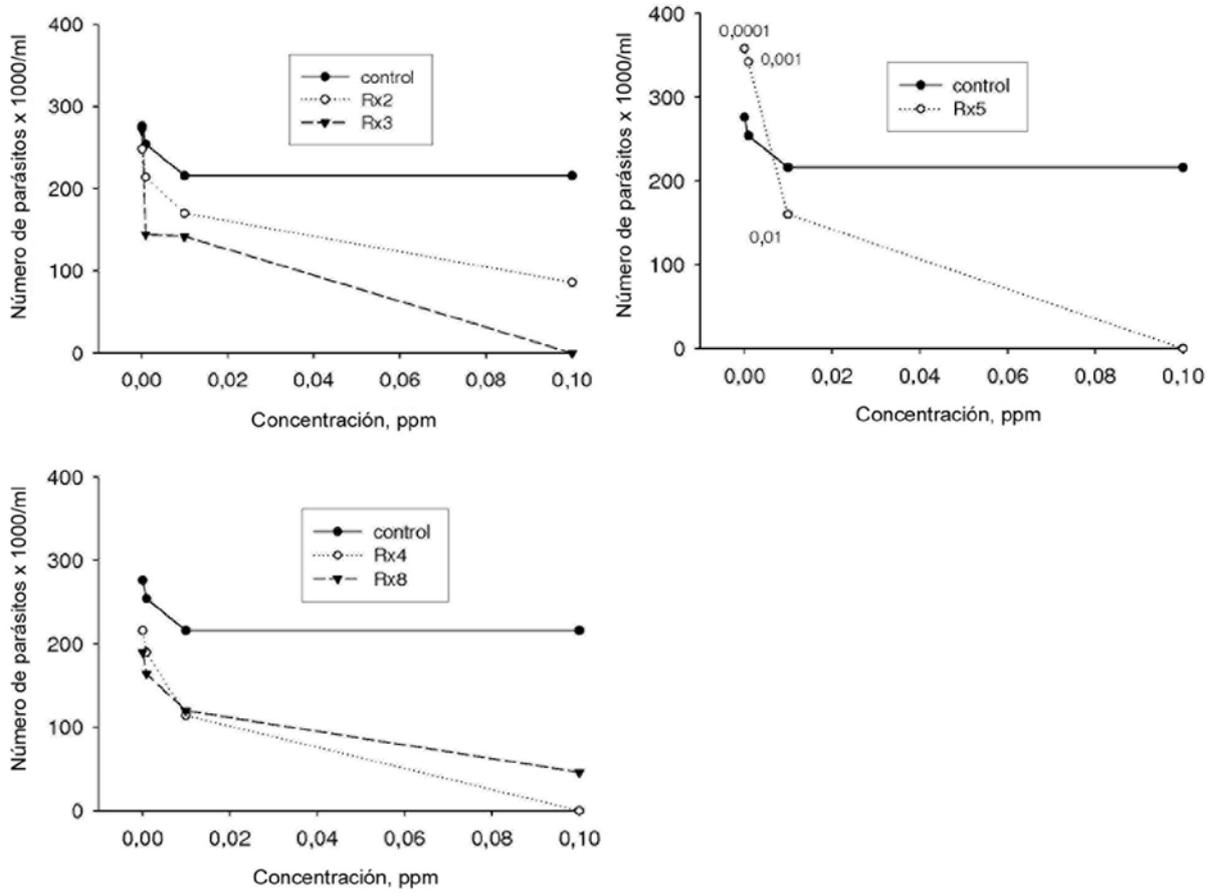


FIGURA 5