

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 484**

51 Int. Cl.:

A61K 31/33 (2006.01)

A61K 31/03 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2014** **PCT/CZ2014/000103**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015** **WO15039638**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2014** **E 14802301 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017** **EP 3054941**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende difenileneiodonio para el tratamiento de enfermedades causadas por los parásitos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae**

30 Prioridad:

20.09.2013 CZ 20130729

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

05.12.2017

73 Titular/es:

**USTAV MOLEKULARNI GENETIKY AV CR, V.V.I.
(100.0%)
Videnska 1083
142 20 Praha 4, CZ**

72 Inventor/es:

**GREKOV, IGOR;
POMBINHO, ANTÓNIO;
SIMA, MATYÁS;
KOBETS, TETYANA;
BARTUNEK, PETR y
LIPOLDOVÁ, MARIE**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 645 484 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que comprende difenileneiodonio para el tratamiento de enfermedades causadas por los parásitos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo uso de difenileneiodonio (DPI) como sustancia activa contra los parásitos de la familia *Trypanosomatidae*, en particular contra los parásitos del género *Leishmania* y *Trypanosoma*.

Antecedentes de la invención

Los parásitos del género *Leishmania* amenazan a una población de 98 países en 5 continentes [Alvar *et al.* 2012]. La leishmaniasis, una enfermedad causada por protozoos parásitos *Leishmania* (incluyendo, por ejemplo, *L. aethiopica*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. tropica*), se produce en zonas intertropicales de América y África y se extiende hasta la zona templada de América del Sur, Asia y el sur de Europa. Dependiendo de la parte del cuerpo que se ve afectada por la enfermedad, se distinguen tres tipos de leishmaniasis: cutánea, mucocutánea y visceral. Se supone que 2 millones de personas (1,5 millones de leishmaniasis cutánea, 0,5 millones de leishmaniasis visceral) son recientemente infectadas al año y 20.000 a 40.000 personas mueren a causa de la enfermedad al año, mientras que recientemente el número total de personas afectadas alcanza los 12 millones en todo el mundo [OMS, 2012]. Dado que la notificación de la enfermedad es obligatoria sólo en 32 de los 98 países afectados por la leishmaniasis, una gran parte de las personas enfermas no se registra en ningún sitio. La enfermedad amenaza no sólo a los residentes de los países endémicos, sino también a los viajeros [Kobets *et al.* 2012] y las fuerzas militares ubicadas en esas áreas. No existe una vacuna eficaz contra la infección y los fármacos en uso poseen muchos efectos secundarios indeseables. Además, los parásitos se volvieron resistentes contra estos fármacos en muchas áreas [Kobets *et al.* 2012].

El impacto de la leishmaniasis en la salud de la población fue fuertemente subestimada durante muchos años. En los últimos 10 años, debido a los cambios climático y ambiental, guerras y otros efectos desconocidos, las áreas endémicas se han extendido en gran medida y el número de casos notificados aumentó. En Europa, por ejemplo, la leishmaniasis se restringió con anterioridad en la región del Mediterráneo, pero ahora se ha propagado hasta el norte de Italia y el sur de Alemania, donde se han notificado decenas de casos de personas que no viajaron fuera de dicha área [Kobets *et al.* 2012], y recientemente se notificaron casos autóctonos de animales infectados en Hungría y Suiza. Lo que es alarmante es el hecho de que *Phlebotomus*, el mosquito que transmite la *Leishmania*, se extiende en una dirección norte-oriental más rápido que lo predicho por los modelos existentes.

No todas las personas que resultan infectadas con *Leishmania* desarrollarán la enfermedad. En la región mediterránea, por ejemplo, se estima que se produce un caso clínico durante aproximadamente 30-100 infecciones subclínicas [Pampiglione *et al.* 1975]. Esta infradeclaración puede tener enormes consecuencias para los bancos de sangre. La sangre de los donantes que viven en áreas endémicas de Grecia fue seropositiva para *Leishmania* en el 15 % de los casos [Kyriakou *et al.* 2003], y en el caso de los donantes procedentes de regiones endémicas de España (Islas Baleares) en el 11 % [Riera *et al.* 2008]. Estas infecciones asintomáticas pueden convertirse en formas clínicas graves en pacientes con un sistema inmunitario comprometido, p. ej., pacientes con SIDA. La coinfección con parásitos *Leishmania* y VIH se está convirtiendo en un grave problema de salud en numerosos países del mundo, debido a que la infección por VIH aumenta el riesgo de desarrollar leishmaniasis visceral en 100 a 2.320 veces, y viceversa, la infección por *Leishmania* aumenta el riesgo de aparición del SIDA [Kobets *et al.* 2012].

Los perros infectados con *Leishmania* representan un grave problema en la medicina veterinaria. Los perros infectados suelen presentar síntomas significativos. No obstante, tanto los perros enfermos como asintomáticos suponen un riesgo para los seres humanos ya que son un reservorio de parásitos, que son transmitidos a los humanos por los insectos. En algunas áreas de Brasil, hasta el 24 % de los perros están infectados con *Leishmania* [Coura-Vital *et al.* 2011], mientras que en algunas partes del sur de Europa, la presencia de anticuerpos contra el parásito muestra que hasta el 34 % de los perros fue detectado con la infección [Kobets *et al.* 2012]. En los últimos años, se observó en los EE.UU leishmaniasis en perros y gatos domésticos. [Petersen, 2009].

No existe vacuna humana segura y eficaz contra la enfermedad. Del mismo modo, no existe un tratamiento adecuado y sencillo sin efectos secundarios [Kobets *et al.* 2012]. Los fármacos que se utilizan para tratar la leishmaniasis visceral [Kobets *et al.* 2012] y que pueden usarse también para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea y muco-cutánea son: antimoniales pentavalentes, anfotericina B, anfotericina B liposomal, miltefosina y paromomicina. Los agentes quimioterapéuticos más antiguos explotados para el tratamiento de la leishmaniasis visceral son las sales de antimonio. En la actualidad, derivados de antimonio estibogluconato de sodio (Pentostam) y antimoniato de meglumina (Glucantime) se administran como inyección intramuscular o intravenosa. La desventaja de estos fármacos es la baja eficacia clínica en algunas áreas, la emergencia de resistencia del parásito (hasta un 60 % en el estado indio de Bihar), la larga duración del tratamiento (30 días), la toxicidad y el elevado precio. Otros agentes quimioterapéuticos eficaces en el tratamiento de la leishmaniasis son fármacos que se desarrollaron originalmente para el tratamiento de otras enfermedades. Es un medicamento para combatir las infecciones

fúngicas, anfotericina B (AmBisome), un medicamento para tratar el cáncer, miltefosina (Impavido), y un antibiótico de amplio espectro, paromomicina. Incluso estos medicamentos no son ideales. Sólo la miltefosina puede administrarse *per os*, pero su eficacia se ve reducida, y en algunos casos la administración de miltefosina lleva a la muerte de un paciente causada por los efectos secundarios de un fármaco [Sundar *et al.* 2012]. La anfotericina B y la anfotericina B liposomal requieren infusión intravenosa y la paromomicina se administra por vía intramuscular. Asimismo estos medicamentos tienen numerosos efectos secundarios, que son, a excepción de paromomicina, caros, y sólo una única mutación es suficiente para que los parásitos se vuelvan resistentes a la miltefosina. La desventaja es también la larga duración del tratamiento [Kobets *et al.* 2012]. Las desventajas de los fármacos individuales pueden reducirse parcialmente por la terapia de combinación [van Griensven *et al.* 2010]. Se describió el éxito del tratamiento con una dosis única de anfotericina B liposomal en la India [Sundar *et al.* 2010], pero estos resultados prometedores aún deben de confirmarse [Edwards *et al.* 2011].

Los protozoos parásitos del género *Trypanosoma* incluyen *T. brucei* y *T. cruzi*, que causan la enfermedad del sueño o la enfermedad de Chagas.

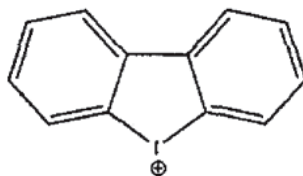
La enfermedad del sueño (también conocida como tripanosomiasis africana) es una enfermedad humana causada por el protozoo *Trypanosoma brucei* y transmitida por una mosca (las moscas) tse-tse. La enfermedad es "endémica" en grandes áreas de África subsahariana (incluyendo 36 países y habitados por cerca de 60 millones de personas). Según la OMS, en el año 2009 en África se notificaron aproximadamente 30.000 nuevos casos de la enfermedad. La enfermedad existe en dos formas o es causada por dos subespecies: *Trypanosoma brucei gambiense* en África Occidental y Central y *Trypanosoma brucei rhodesiense* en África Oriental y Meridional, la subespecie enumerada como la segunda es mucho más agresiva y de acción más rápida. Para el tratamiento de la enfermedad del sueño, dependiendo de la etapa de la enfermedad, se usan pentamidina, melarsoprol y suramina, sin embargo, estos fármacos presentan una serie de efectos secundarios, pueden causar anemia o daño renal. La prevención de la enfermedad del sueño es prácticamente imposible ya que no existe una vacuna eficaz.

La enfermedad de Chagas (también conocida como tripanosomiasis americana) es una enfermedad parasitaria tropical causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, que se transmite a través de la mordedura de insectos triatomínicos hematófagos (también conocidos como "vinchucas"). El insecto infectado transmite la infección sólo en el caso de que defeque heces infectadas durante la mordida. No obstante, la transmisión puede no ocurrir sólo a través de la mordedura de las vinchucas. La enfermedad puede ser transmitida por la sangre de una persona a otra (por ejemplo, durante una transfusión o trasplante de órganos, o durante el embarazo la madre infectada puede infectar a su hijo no nacido). La OMS estima que 7-8 millones de personas están infectadas con este parásito. El periodo de incubación es de una a cuatro semanas (en caso de infección por transfusión sanguínea, el periodo de incubación puede extenderse hasta 6 semanas). La enfermedad afecta principalmente al corazón, intestino y cerebro. El tratamiento médico es eficaz sólo en la fase inicial de la enfermedad y la vacunación contra la enfermedad no existe. Los fármacos en uso son Nifurtimox y Benznidazol, su desventaja es una considerable toxicidad, ambos fármacos causan reacciones adversas graves del sistema digestivo y nervioso.

Trypanosoma brucei brucei causa la enfermedad en los animales (p. ej., caballos, camellos, búfalos acuáticos), pero no en los seres humanos.

De todos los datos anteriores, resulta evidente que existe una necesidad de un nuevo fármaco con actividad contra protozoos parásitos de la familia *Tripanosomatidae*, que no requiera un tratamiento complicado y tenga menos efectos secundarios que los medicamentos usados en la actualidad, y estén disponibles en las áreas endémicas.

El difenileneiodonio ([1,1'-bifenil]-2,2'-diiliodonio, DPI) es un compuesto que tiene la siguiente fórmula:



Se ha demostrado en ratas que el sulfato de difenileneiodonio previene el daño hepático inducido por alcohol [Kono *et al.* 2001]. El documento WO 20071080598 desveló una composición farmacéutica que comprende DPI o sal del mismo para inhibir la proliferación de neointima y prevenir la reestenosis. El documento WO 2012/135588 desveló el uso de cloruro de difenileneiodonio como agente quimioterapéutico en el tratamiento de tumores serosos.

Se notificó previamente que DPI mata el parásito de la malaria *Plasmodium falciparum* ($CI_{50} = 0,001-0,00006 \mu M$) [Yuan *et al. Nat Chem Biol* 5:765-771, 2009].

La actividad de DPI contra los parásitos de la familia *Tripanosomatidae* aún no se conoce.

Descripción de la invención

Los inventores de la presente invención ensayaron la biblioteca de 2.448 compuestos químicos, incluyendo las siguientes colecciones: "Biblioteca de compuestos farmacológicamente activos" (LOPAC1280, Sigma-Aldrich), "Biblioteca química de Prestwick" (Illkirch, Francia) y "Colección clínica de NIH" (NIH, EE.UU.). Los compuestos se identificaron sistemáticamente para la inhibición del crecimiento del parásito *Leishmania major*. Esta identificación sistemática primaria dio lugar a la identificación de difenileneiodonio (DPI) como un inhibidor eficaz.

En otros ensayos, los inventores descubrieron sorprendentemente que DPI ejerce una actividad significativa contra los parásitos de la familia *Trypanosomatidae*, *Leishmania major* y *Trypanosoma brucei brucei*. En los ensayos que se incluyeron en la identificación sistemática secundaria, y descritos con detalle en los Ejemplos, se demostró que DPI inhibe eficazmente el crecimiento de parásitos del género *Leishmania* en forma promastigote (es decir, forma que vive en el insecto vector). Se estableció el valor de $CI_{50} = 0,010 \mu M$, que era significativamente inferior al valor de los fármacos actuales, tales como anfotericina B ($CI_{50} = 0,039 \mu M$). Además, DPI también es eficaz en matar a parásitos del género *Leishmania* en forma amastigote (es decir, forma que se encuentra en los macrófagos), mientras que el valor de $DL_{50} = 0,066 \mu M$ descubierto por los inventores también es inferior al valor del mejor fármaco actual anfotericina B ($DL_{50} = 0,143 \mu M$).

Además, los ensayos *in vivo* en ratones infectados demostraron que la administración de DPI condujo a una reducción significativa en el número de parásitos en el bazo de ratones infectados.

Los ensayos también demostraron que la forma sanguínea del parásito *Trypanosoma brucei brucei* es matada por el tratamiento con DPI con una alta eficacia, se observó el valor $CL_{50} = 0,85 \mu M$.

Por lo tanto, DPI puede ser útil como medicamento para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, preferentemente parásitos del género *Leishmania* y *Trypanosoma*, específicamente, por ejemplo, enfermedades causadas por *Leishmania major* o *Trypanosoma brucei brucei*.

Un aspecto de la presente invención se refiere a difenileneiodonio o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos de la familia *Trypanosomatidae*. Preferentemente, DPI se puede usar en el tratamiento de una enfermedad que es causada por parásitos del género *Leishmania* y *Trypanosoma*. Más preferentemente, se usa en el tratamiento de la enfermedad causada por el parásito *Leishmania major*. En otro aspecto más preferente, la solicitud se refiere al tratamiento de una enfermedad causada por el parásito *Trypanosoma brucei brucei*.

Una composición farmacéutica que comprende un DPI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es útil para tratar seres humanos o puede usarse en la medicina veterinaria. El tratamiento médico debe entenderse como profilaxis como tratamiento curativo.

En la preparación farmacéutica, DPI también puede estar presente en forma de sales farmacéuticamente aceptables (no tóxicas, fisiológicamente aceptables), de naturaleza orgánica o inorgánica. El experto en la materia es capaz de preparar de forma rutinaria sales adecuadas.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden DPI o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como principio activo se pueden formular, por ejemplo, para administración sistémica, p. ej., administración enteral, p. ej., oral, p. ej., en forma de comprimidos o cápsulas, para administración rectal, p. ej., en forma de supositorios, para administración nasal o por inhalación, p. ej., como pulverización o gotas. Las composiciones pueden formularse preferentemente para administración parenteral, tal como inyección (IV, IM, SC), o para la administración por medio de una infusión o sistema de depósito implantable. Un experto en la materia apreciará que este listado no sea exhaustivo y tal persona es consciente de otros métodos adecuados.

Normalmente, la sustancia activa está presente en la composición farmacéutica junto con excipientes, tales como materiales de relleno, disgregantes, diluyentes, disolventes, aglutinantes, agentes emulsionantes, tampones, agentes estabilizantes, conservantes y agentes colorantes. Los excipientes y su uso son bien conocidos por el experto en la materia.

DPI puede comprenderse en composiciones farmacéuticas en combinación con otra sustancia activa, p. ej., con un compuesto que presenta un efecto sinérgico.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención comprenden DPI o sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una cantidad farmacéuticamente eficaz. El método de determinación de la cantidad farmacéuticamente eficaz es un procedimiento rutinario bien conocido por el experto en la materia.

La determinación de una dosis de DPI en forma de dosificación unitaria, p. ej., cápsula o concentración adecuada en solución, p. ej., solución para inyección o infusión, es un procedimiento rutinario que es conocido por un experto en la materia.

El conocimiento del experto mencionado anteriormente en relación con los productos farmacéuticos, formas farmacéuticas, excipientes, etc. se ha resumido en manuales especializados (Gennaro, A.R. *et al.* Remington: *The Science and Practice in Pharmacy*. 20. Edición. Lippincot Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, Kibbe, A. H. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press, Londres, 2000, Chalabala, M. *et al.*: *Technologie léku* (Medicaments Technology), Galén, Praga, 2001) fácilmente disponibles para los expertos en la materia y también en la Farmacopea Checa (CL 2009), en la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) y/o en la Farmacopea Estadounidense (USP).

Descripción de la figuras

FIG. 1. Efecto de DPI en *Leishmania major* en forma promastigote (A), incluyendo cepas resistentes a sales de antimonio (B)

FIG. 2. Efecto de DPI en *Leishmania major* en forma amastigote (la forma que vive en los macrófagos huésped)

FIG. 3. Efecto de DPI *in vivo* en la reducción del número de parásitos en el bazo de ratones infectados

FIG. 4. Efecto de DPI en la forma sanguínea del parásito *Trypanosoma brucei brucei*

FIG. 5. Determinación del efecto de DPI sobre la viabilidad de células humanas

Ejemplos de la invención

EJEMPLO 1

Identificación sistemática primaria

DPI se identificó al ensayar la biblioteca de 2.448 compuestos químicos que comprende "Biblioteca de compuestos farmacológicamente activos" (LOPAC1280, Sigma-Aldrich), "Biblioteca química de Prestwick" (Illkirch, Francia) y "Colección clínica de NIH" (NIH, EE.UU.). Los compuestos se reformatearon en placas de polipropileno de 384 pocillos (Corning, cat. n.º 3657) a una concentración final de 1 µM en DMSO y se usaron para identificar sistemáticamente la inhibición del crecimiento del parásito *Leishmania major*.

La identificación sistemática primaria resultó en el hallazgo de que DPI es un potente inhibidor del crecimiento de *Leishmania major*. Por lo tanto, DPI, en forma de cloruro de difenileneiodonio, se ensayó adicionalmente en experimentos *in vitro* (Sigma, St. Louis, MO, cat. n.º D2926) y en experimentos *in vivo* (Sigma, St. Louis, MO, cat. n.º D2926 o AG Scientific, San Diego, CA, cat. n.º D-1011), como se describirá en los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 2

Efecto citostático de DPI en *Leishmania major* en forma promastigote (Fig. 1A, 1B)

La actividad antiparasitaria en cultivo de promastigotes (forma de insecto) se midió usando un método de microdilución convencional, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la muestra de ensayo, lo que conduce a la inhibición del crecimiento del parásito.

Leishmania major LV 561 (MHOM/EL/67/LRC-L137 JERICHO II) se almacenó en el recubrimiento de 10 % de dimetilsulfóxido en nitrógeno líquido como subcultivo 0. Las muestras almacenadas se descongelaron y los parásitos se cultivaron durante 7 días a 23 °C en un medio bifásico SNB-9 (solución salina-neopeptona-sangre-9) [Grekov *et al.* 2011]. La fase sólida y el recubrimiento de SNB-9 se prepararon a partir de los siguientes ingredientes: agar BactoTM (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, cat. n.º 214010), neopeptona BactoTM (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, cat. n.º 211681), NaCl y sangre de conejo desfibrinada (Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané, República Checa). La solución de recubrimiento se suplementó con 50 mg/ml de gentamicina (Sigma, St. Louis, MO, cat. n.º G1272). Para los ensayos de inhibición del crecimiento de promastigotes, el subcultivo 2 de *L. major* se cultivó en un medio de insectos de Schneider (Sigma, St. Louis, MO, cat. n.º S0146) suplementado con 50 µm/ml de gentamicina (Sigma, St. Louis, MO, cat. n.º G1272), 63,7 µg/ml de penicilina G (Sigma, St. Louis, MO, cat. n.º PENK), 100 µg/ml de estreptomina (Sigma, St. Louis, MO, cat. n.º S6501), 2 % de orina humana y suero fetal bovino inactivado por calor al 10 % (Sigma, St. Louis, MO, cat. n.º F2442).

Los promastigotes de *Leishmania* en la fase de crecimiento logarítmico se distribuyeron en placas negras de 384 pocillos (Corning, Nueva York, NY, cat. n.º 3571) a una concentración de 15.000 parásitos/µl/pocillo usando un instrumento Multidrop Combi (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). Inmediatamente después, DPI (1 nM-500 nM) o anfotericina B (20 nM-10 mM) se añadieron usando "pitool" conectado a una estación de trabajo automatizada JANUS® (PerkinElmer Inc., Waltham, MA) y se incubaron durante 48 horas. La capacidad metabólica del parásito se midió después de 2,5 horas de incubación usando el reactivo CellTiter-Blue® (Promega Corporation, Madison, WI, cat. n.º G8082) usando un lector EnVision Multilabel (PerkinElmer Inc., Waltham, MA). Los datos se analizaron

mediante regresión no lineal (log (inhibidor) vs. respuesta - pendiente variable). La preparación de los gráficos y el cálculo de CI_{50} se realizaron usando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EE.UU.). El valor de CI_{50} se calculó por el método de regresión no lineal como la concentración de DPI en la que el número de promastigotes viables se redujo en un 50 % (valores dados a continuación en la Tabla 1).

El efecto de DPI contra promastigotes de *Leishmania major*, determinado como se ha descrito anteriormente, se ilustra en la FIG. 1A y 1B (incluyendo cepas resistentes a las sales de antimonio). Las figuras muestran el porcentaje de promastigotes de *L. major* que viven en cultivos a los que se añadieron DPI o anfotericina B en comparación con el cultivo de control (tomado como 100 %).

Efecto citotóxico de DPI en *Leishmania major* en forma amastigote (FIG. 2)

Los precursores de macrófagos se aislaron de la médula ósea y se incubaron durante 7 días a 37 °C y CO_2 al 5 % en DMEM suplementado con sobrenadante de células L929 (20 por ciento en volumen) que contienen FECG. Tras la diferenciación, los macrófagos se infectaron con *L. major* que expresa E-GFP en la fase estacionaria de crecimiento en una relación de 1:10. A continuación, los macrófagos se incubaron en DMEM suplementado con el sobrenadante de células L929 (20 % de volumen) que contienen FECG a 37 °C y CO_2 al 5 %. Después de 24 horas, el medio que contiene los parásitos extracelulares se desechó y las placas se lavaron 3 veces con medio SSEH (solución salina equilibrada de Hanks, Sigma, St. Louis, MO, cat. n.º H9269). En la etapa final, SSEH se reemplazó con DMEM suplementado y las muestras se incubaron durante otras 24 horas para poder transformar los promastigotes en amastigotes. A continuación, se añadieron las sustancias de ensayo en concentraciones de 7,8 nM a 2 nM. Después de 48 horas de co-incubación con las sustancias, los macrófagos se tiñeron con 1 µg/ml de láser de colorante estiril-751 (LDP-751) en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, el medio se aspiró, los macrófagos se lavaron lejos de la placa con TFS frío que contiene glucosa 10 mM (Sigma, St. Louis, MO, cat. n.º G5400) y EDTA 3 mM (Sigma, St. Louis, MO, cat. n.º 3365).

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) usando el software CellQuest Pro (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). Detectores usados: dispersión directa (FSC) (dispersión frontal), dispersión lateral (SSC) (dispersión hacia los lados), FL1 (emisión a 530 ± 15 nm) detector para GFP, FL3 (emisión >670 nm - "filtro de paso largo") detector para LDS-751. Los resultados se midieron para 10.000 macrófagos en el primer experimento y para 20.000 macrófagos en el segundo experimento. Las células muertas negativas para LDS-751 se excluyeron del análisis. Los resultados se procesaron usando una regresión no lineal (log (inhibidor) vs. respuesta - pendiente variable).

Los resultados del ensayo anterior se muestran gráficamente en la FIG. 2.

Para comprobar los resultados anteriores obtenidos por citometría de flujo (CMF), se prepararon frotis celulares a partir de suspensiones celulares de macrófagos peritoneales tratados con DPI a concentraciones de 2,7 nM, 24,7 nM, 0,222 µM y 2,0 µM. Los frotis se tiñeron con Giemsa (Sigma, St. Louis, MO, cat. n.º 11700) y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia Leica6000DM (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) a un aumento de 400x. Se determinó el número total de parásitos en 500 macrófagos. Los resultados se procesaron usando regresión no lineal ("disminución exponencial monofásica").

Los valores de DL_{50} tanto para la citometría de flujo como de los frotis celulares se calcularon como la concentración a la que el número de macrófagos infectados disminuyó en un 50 %. Se crearon los gráficos y el valor de DL_{50} se calculó usando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EE.UU.). Los valores de CI_{50} y DL_{50} se muestran en la Tabla 1.

TABLA. 1. Valores de DL_{50} y CI_{50} determinados a partir de los resultados de ensayos que se muestran en la FIG. 1A, 1B y 2B. Amf B = anfotericina B

	DPI	Amf B
<i>L. major</i> , en forma promastigote (CI_{50} , µM)	0,010	0,039
<i>L. major</i> , resistente a sales de antimonio, en forma promastigote (CI_{50} , µM)	0,015	0,043
<i>L. major</i> , en forma amastigote intracelular (DL_{50} , µM)	0,066	0,143

Los ensayos mostraron que el DPI es eficaz en la inhibición del crecimiento de parásitos del género *Leishmania* en forma promastigote (una forma que vive en los vectores de insectos). El valor de CI_{50} = 0,010 µM es significativamente inferior al valor de los fármacos actuales, tales como anfotericina B (CI_{50} = 0,039 µM).

Además, se demostró que el DPI es eficaz en matar a los parásitos del género *Leishmania* en forma amastigote (forma que se encuentra en los macrófagos). El valor de DL_{50} = 0,066 µM descubierto para DPI es significativamente inferior al valor de anfotericina B (DL_{50} = 0,143 µM).

EJEMPLO 3

Efecto de DPI *in vivo* (FIG. 3)

5 Ratones hembra BALB/c (8-11 semanas de vida) se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos experimentales de 8-9 animales: 1) control no infectado; 2) control no tratado infectado; 3) administración de 2,5 mg/kg/día (MKD) de anfotericina B; 4) administración de 0,5 MKD de DPI. Los promastigotes de *L. major* (10×10^6) del subcultivo 2 de 7 días en 50 µl de solución salina estéril (TFS) se inocularon por vía subcutánea en la raíz de la cola del ratón. Los ratones de control no infectado se inocularon con solución salina estéril. La aplicación del fármaco convencional (anfotericina B) y la sustancia de ensayo (DPI) comenzó la segunda semana después de la infección cuando la mayoría de los ratones habían desarrollado una hinchazón en el sitio de la inyección parasitaria. Durante los siguientes 28 días, el grupo 3 se trató diariamente por inyección intraperitoneal de fármaco convencional anfotericina B, y el grupo 4 mediante la inyección de DPI en 20 % de DMSO en TFS, y los grupos 1 y 2 en un volumen idéntico de 20 % de DMSO en TFS. El tamaño de la lesión de la piel se midió semanalmente mediante un calibrador. Los ratones se sacrificaron a las 6 semanas después de la infección y se extrajo el bazo para su análisis. El número de parásitos en el bazo se determinó usando PCR-ELISA de acuerdo con el procedimiento descrito en Kobets *et al. Nature Protocols*, 5 (6): 1074-1080, 2010. Brevemente, se aisló el ADN total usando procedimientos convencionales (<http://www.mrcgene.com/tri.htm>) de reactivo TRI (Molecular Research Center, Cincinnati, EE.UU.). Para la amplificación por PCR, los cebadores fueron: cebador F marcado con digoxigenina 5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3' y cebador R biotinilado 5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3' (VBC Genomics Biosciences Research, Austria) que orientan selectivamente 120 pb de la región conservada de ADN en el minicírculo de cinetoplasto de *Leishmania*. Cada reacción se realizó usando 50 ng de ADN aislado. 20 ng de ADN de *L. major* se usó como control positivo y el amplificado sirvió como el patrón de concentración más elevado. La amplificación por PCR se realizó con 30 ciclos. Un número de parásitos se determinó mediante análisis del producto de PCR usando un protocolo ELISA modificado (Pharmingen, San Diego, EE.UU.). La concentración de ADN de *Leishmania* se evaluó mediante el lector ELISA Tecan y el programa KIM-E (Schoeller Pharma, Praga, República Checa), en el que la curva de calibrado se evaluó mediante el análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados.

El efecto de DPI *in vivo* en la reducción de parásitos de *L. major* en el bazo de ratones infectados se muestra en la FIG. 3.

En el ensayo *in vivo* que se ha descrito anteriormente, se demostró que la administración de DPI resultó en una reducción estadísticamente significativa en el número de parásitos en el bazo de los ratones infectados, en un nivel comparable al observado para un grupo tratado con el fármaco convencional de anfotericina B.

EJEMPLO 4

Efecto de DPI en la forma de torrente sanguíneo del parásito *Trypanosoma brucei brucei* (FIG. 4)

40 *Trypanosoma brucei brucei* AnTarl fue un regalo de Jan van den Abbeele, Instituto de Medicina Tropical "Príncipe Leopold", Amberes, Bélgica. Los parásitos se almacenaron en nitrógeno líquido y antes del experimento se descongelaron y se usaron para infectar ratones por inoculación intraperitoneal. Seis a siete días después de la infección, los ratones infectados fueron sacrificados por dislocación cervical, la sangre se extrajo de la cavidad del pecho después de la rotura de la aorta y se mezcló en una relación de 1:5 con HMI-11 (medio modificado de Iscove (Sigma, St. Louis, MO, cat. n.º I6529,) suplementado con L-cisteína 1,5 mM, 2-mercaptoetanol 0,2 mM, piruvato de sodio 1 mM, timidina 0,16 mM, 100 µg/ml de estreptomycin, 63,7 µg/ml de penicilina G y SFB inactivado por calor al 20 %) [Hiru Hiru & 1989]. La suspensión se centrifugó a 200 g durante 5 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante. Se determinó el número de formas de torrente sanguíneo de *T. brucei brucei* en el sobrenadante por recuento en una cámara de Bürker. El cultivo se diluyó en HMI-11 a una densidad de 4×10^6 parásitos/ml, y los parásitos se cultivaron durante 3 horas a 37 °C, CO₂ al 5 % en placas de cultivo de 48 pocillos (Costar, cat. n.º 3548), 0,5 ml/pocillo. Las placas se cubrieron luego con parafilm para evitar el intercambio de gases y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Los parásitos sobrevivieron otras 24 horas a aproximadamente la misma densidad y entonces podrían usarse para ensayar los efectos antiparasitarios de DPI.

55 Para determinar los efectos antiparasitarios de DPI, los parásitos se cultivaron de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. Al comienzo del cultivo se añadió DPI a los cultivos de ensayo dando lugar a diferentes concentraciones molares (0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 y 9 µM). Los cultivos paralelos se ensayaron con las mismas concentraciones de pentamidina (sal de potasio de pentamidina), que sirvió como la sustancia de referencia (es un medicamento que se usa habitualmente), y los cultivos sin adición de sustancias activas como control. Dos experimentos independientes se llevaron a cabo y en cada uno de ellos se llevaron a cabo cultivos individuales por duplicado. El número de parásitos vivos (células móviles) en cultivos individuales se contaron después de 24 h de cultivo en la cámara de Bürker.

El efecto de DPI en la forma de torrente sanguíneo del parásito *Trypanosoma brucei brucei* se ilustra gráficamente en la FIG. 4. Para DPI, se observó el valor de CL₅₀ = 0,85 µM, que es superior a un valor de la sustancia de referencia pentamidina (CL₅₀ = 0,14 µM). Sin embargo, es interesante que DPI actúe tanto sobre *Leishmania* como

Trypanosoma. Esto indica el hecho de que el DPI puede actuar sobre un mecanismo común de estos parásitos. El valor de CL_{50} se designó como la concentración que provoca una reducción de parásitos vivos en un 50 % en comparación con el control negativo. Los valores de CL_{50} se determinaron usando la curva logaritmo de tres parámetros (inhibidor) vs. respuesta en GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EE.UU.). Esta curva se seleccionó como adecuada para la adaptación de los datos medidos. La curva se ajustó a los datos por análisis de mínimos cuadrados.

EJEMPLO 5

10 Determinación de la citotoxicidad de DPI para las células humanas (FIG. 5)

Las células humanas CCD 841 (células epiteliales intestinales) y MRC5 (fibroblastos de pulmón fetal) en medio de crecimiento apropiado se distribuyeron en placas negras de 384 pocillos (Corning, cat. n.º 3571) a una densidad de 15.000 células/25µl/pocillo usando un Multidrop Combi (Thermo Scientific). Después de 48 horas de incubación a 37 °C y CO₂ al 5 %, la viabilidad celular se determinó usando un ensayo comercial que representa el ensayo de viabilidad celular CellTiter Blue (Promega, cat. n.º G8082). La citotoxicidad se determinó después de 4 horas a 37 °C y CO₂ al 5 % usando un ensayo comercial que representa un ensayo de membrana homogéneo CytoTox-ONE (Promega, cat. n.º G7892). La intensidad de fluorescencia se midió por el detector (lector) EnVision (Perkin Elmer) y se analizaron los datos medidos usando el software Prism5 (GraphPad Software, Inc.).

La viabilidad de las células como dependiente de la concentración de DPI se muestra en la FIG 5. Las concentraciones de DPI, en las que se produce una actividad antiparasitaria significativa, es decir, en el intervalo de 9,8 nM-1,25 M (véanse los ejemplos 1 y 2), no mostró efecto negativo alguno sobre la viabilidad de células humanas CCD 841 y MRC5. Por ende, las concentraciones de DPI eficaces anti-parasitariamente no son citotóxicas para las células humanas.

Referencias

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; the WHO Leishmaniasis Control Team. *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence*. PLoS One. 2012;7(5):e35671.

Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Reis LE, Braga SL, Moraes MH, Reis AB, Carneiro M. *Prevalence and factors associated with Leishmania infantum infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods*. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(8):e1291.

Edwards T, Omollo R, Khalil EA, Yifru S, Musa B, Musa A, Wasunna M, Smith PG, Royce C, Ellis S, Balasegaram M, Hailu A. *Single-dose liposomal amphotericin B (AmBisome®) for the treatment of visceral leishmaniasis in East Africa: study protocol for a randomized controlled trial*. Trials. 2011;12:66.

Grekov I, Svobodová M, Nohýnková E, Lipoldová M. *Preparation of highly infective Leishmania promastigotes by cultivation on SNB-9 biphasic medium*. J Microbiol Methods. Diciembre de 2011;87(3):273-7.

Hirumi H, Hirumi K. *Continuous cultivation of Trypanosoma brucei blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers*. J Parasitol. Diciembre de 1989;75(6):985-9.

Kobets T, Badalová J, Grekov I, Havelková H, Svobodová M, Lipoldová M. *Leishmania parasite detection and quantification using PCR-ELISA*. Nat Protoc. Junio de 2010;5(6):1074-80.

Kobets T, Grekov I, Lipoldová M. *Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment*. Curr Med Chem. 2012;19(10):1443-74.

Kono H, Rusyn I, Uesugi T, Yamashina S, Connor HD, Dikalova A, Mason RP, Thurman RG. *Diphenyleneiodonium sulfate, an NADPH oxidase inhibitor, prevents early alcohol-induced liver injury in the rat*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. Mayo 2001;280(5):G1005-12.

Kyriakou DS, Alexandrakis MG, Passam FH, Kourelis TV, Foundouli P, Matalliotakis E, Maniatis AN. *Quick detection of Leishmania in peripheral blood by flow cytometry. Is prestorage leucodepletion necessary for leishmaniasis prevention in endemic areas?* Transfus Med. 2003;13(2):59-62.

Pampiglione S, Manson-Bahr PE, La Placa M, Borgatti MA, Musumeci S. *Studies in Mediterranean leishmaniasis. 3. The leishmanin skin test in kala-azar*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1975; 69(1):60-8.

Petersen CA. *Leishmaniasis, an emerging disease found in companion animals in the United States*. Top Companion Anim Med. 2009; 24(4):182-8.

Riera C, Fisa R, López-Chejade P, Serra T, Girona E, Jimenez M, Muncunill J, Sedeño M, Mascar6 M, Udina M, Gállego M, Carrió J, Forteza A, Portús M. *Asymptomatic infection by Leishmania infantum in blood donors from the Balearic Islands (España). Transfusion.* Julio de 2008;48(7):1383-9.

Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Rai M, Murray HW. *Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. N Engl J Med.* 2010;362(6):504-12.

Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, Boelaert M, Dujardin JC, Chakravarty J. *Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. Clin Infect Dis.* 2012; 55(4):543-50.

OMS: *Leishmaniasis* (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>) (1. 8. 2012)

Yuan J, Johnson RL, Huang R, Wichterman J, Jiang H, Hayton K, Fidock DA, Wellems TE, Inglese J, Austin CP, Su XZ. *Genetic mapping of targets mediating differential chemical phenotypes in Plasmodium falciparum. Nat Chem Biol.* Octubre de 2009;5(10):765-71.

REIVINDICACIONES

1. Difenileneiodonio o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de enfermedades causadas por los parásitos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*.
- 5 2. Difenileneiodonio o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de enfermedades causadas por los parásitos pertenecientes al género *Leishmania*.
- 10 3. Difenileneiodonio o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de enfermedades causadas por el parásito *Leishmania major*.
4. Difenileneiodonio o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de enfermedades causadas por los parásitos pertenecientes al género *Trypanosoma*.
- 15 5. Difenileneiodonio o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de enfermedades causadas por el parásito *Trypanosoma brucei brucei*.

FIG. 1A

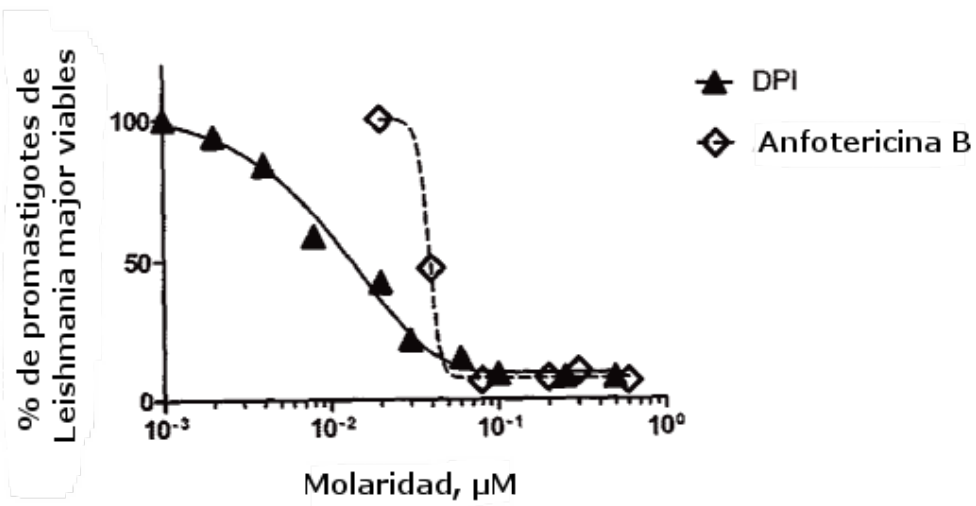


FIG. 1B

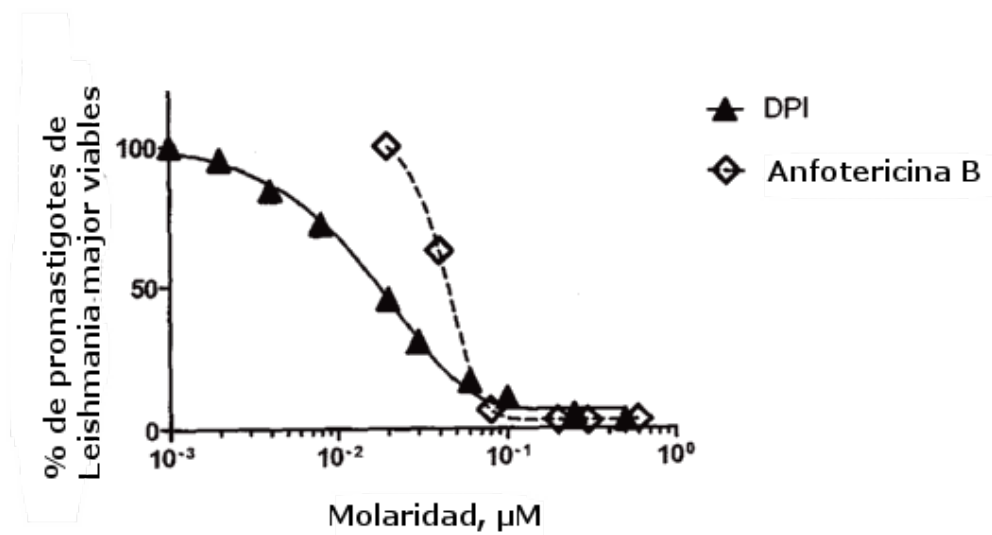


FIG. 2

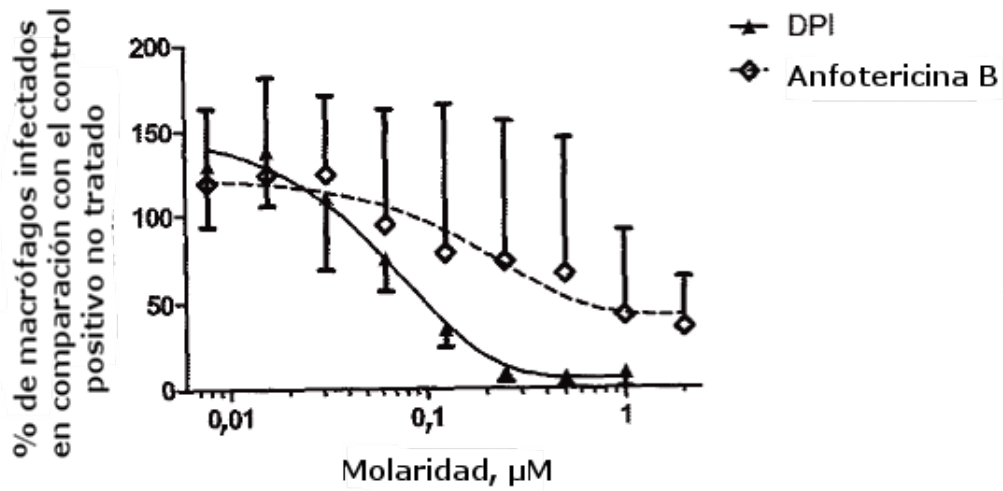


FIG. 3

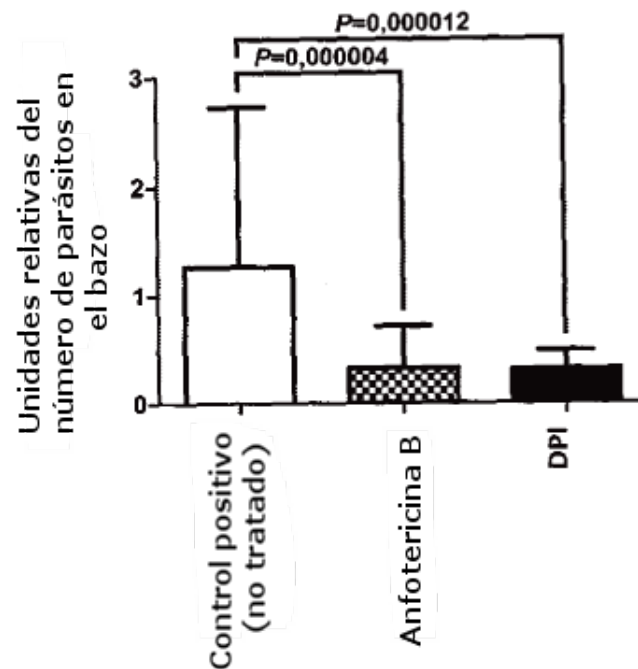
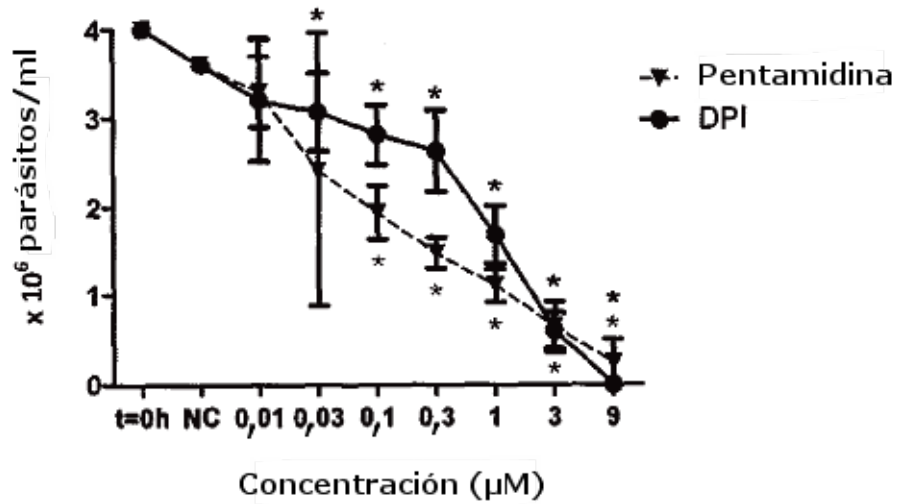


FIG. 4

Efecto de DPI y Pentamidina en el cultivo de la forma de torrente sanguíneo de *Trypanosoma brucei* después de 24 h



CL₅₀ = 0,85 μM

FIG. 5

