

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 191**

51 Int. Cl.:

A61K 31/343	(2006.01)	A61K 47/14	(2007.01)
A61P 33/02	(2006.01)	A61K 9/06	(2006.01)
A61K 31/685	(2006.01)		
A61K 31/7048	(2006.01)		
A61K 31/133	(2006.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		
A61K 45/06	(2006.01)		
A61K 47/10	(2007.01)		
A61K 9/107	(2006.01)		
A61K 47/38	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2013 PCT/EP2013/060513**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13182423**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2013 E 13725136 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2852385**

54 Título: **Dronedarona para su uso en leishmaniasis, formulaciones y asociaciones para su uso en leishmaniasis**

30 Prioridad:

22.05.2012 US 201261650182 P
31.10.2012 EP 12306362
28.11.2012 EP 12306472

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.04.2020

73 Titular/es:

SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR

72 Inventor/es:

BEILLES, STÉPHANE;
CHAM BONNET, SANDRA y
COLLAVERI, JEAN-PIERRE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 753 191 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

Dronedarona para su uso en leishmaniasis, formulaciones y asociaciones para su uso en leishmaniasis

5 La presente invención se refiere a dronedarona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para el tratamiento de leishmaniasis, en particular leishmaniasis cutánea con sus diversas cepas en todo el mundo, y/o leishmaniasis generada de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, o *Leishmania major*, además de a la formulación, en particular formulación tópica, que comprende dronedarona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, a su preparación y a su aplicación terapéutica.

10 Se describen el 2-n-butil-3-[4-(3-di-n-butilaminopropoxi)benzoil]-5-metilsulfonamidobenzofurano, o dronedarona, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en particular sus sales de clorhidrato, en la patente europea EP 0 471 609 B1.

Además, la dronedarona se indica para reducir el riesgo de hospitalización por fibrilación auricular en pacientes en ritmo sinusal con una historia de fibrilación auricular (FA) paroxística o persistente o se indica para el mantenimiento de ritmo sinusal después de cardioversión satisfactoria en pacientes adultos clínicamente estables con fibrilación auricular (FA) paroxística o persistente.

15 Paniz-Mondolfi et al. desvelan el efecto antiparasítico de la amiodarona contra *Leishmania*. Mencionan la dronedarona como resultado de desarrollo adicional en el campo de la cardiología con menos efectos secundarios intensos que la amiodarona (Paniz-Mondolfi et al., 2008, Therapeutics and Clinical Risk Management, páginas 659-663).

20 Sorprendentemente, el solicitante ha mostrado ahora que la dronedarona se puede usar para tratar leishmaniasis. Especialmente, el solicitante propuso formulaciones para administración tópica que son adecuadas para tratar leishmaniasis.

En realidad, para ser eficaz, dicha formulación debe permitir la penetración/liberación del principio activo en la capa de la piel donde se localizan los parásitos.

25 Entonces sería posible obtener altas concentraciones del fármaco activo locamente en la dermis, y evitar la alta concentración plasmática del fármaco y efectos secundarios sistémicos asociados. Una característica adicional de dicha formulación es evitar/reducir las reacciones de toxicidad de la piel en contacto con la formulación.

Además, es posible la asociación de dronedarona con otros agentes anti-leishmaniasis y tiene varias ventajas tales como disminuir la dosis de fármacos administrados para evitar los efectos secundarios y evitar la aparición de resistencias al tratamiento elegido con el tiempo.

30 Así, la presente invención se refiere a la formulación, en particular formulación tópica, que comprende dronedarona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, a su preparación y a su aplicación terapéutica, tal como el tratamiento de leishmaniasis, en particular la leishmaniasis cutánea y/o leishmaniasis generada de cepas de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani* o *Leishmania major*.

35 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica, en particular para administración tópica (composición farmacéutica tópica) que comprende dronedarona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para administración tópica, a su preparación y a su aplicación terapéutica, tal como tratamiento de leishmaniasis, en particular leishmaniasis cutánea y/o leishmaniasis generada de cepas de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani* o *Leishmania major*.

40 La presente invención también se refiere al uso de dronedarona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para la preparación de una medicina para el tratamiento de leishmaniasis particularmente leishmaniasis cutánea y/o leishmaniasis generada de cepas de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani* o *Leishmania major*.

45 La presente invención también se refiere a dronedarona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento de leishmaniasis, particularmente leishmaniasis cutánea y/o leishmaniasis generada de cepas de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani* o *Leishmania major*.

Dicha sal farmacéuticamente aceptable de dronedarona es la sal de clorhidrato.

En una realización, dicha leishmaniasis se genera de cepas de *Leishmania* resistentes a derivados de antimoniales pentavalentes, y en particular cepas de *Leishmania amazonensis*, resistentes a derivados de antimoniales pentavalentes, en particular resistentes a antimoniato de meglumina.

50 Se puede mencionar que las formulaciones de antimoniato de meglumina se comercializan en particular con la marca registrada Glucantime®.

Dicha formulación tópica o composición farmacéutica puede ser un gel hidroalcohólico, una fórmula cerosa hidrófila semisólida, una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, particularmente un gel hidroalcohólico.

Dicha formulación tópica o composición farmacéutica puede comprender un excipiente tal como hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), en particular HPMC a 2 % de peso total de formulación.

- 5 En una realización, dicha formulación tópica o composición farmacéutica puede ser un gel hidroalcohólico que comprende al menos hidroxipropilmetilcelulosa como excipiente.

Dicha formulación tópica o composición farmacéutica, en donde se puede usar dronedarona o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en una proporción de 10 % en peso del principio activo en forma de base.

- 10 Pueden ser apropiadas dosificaciones más altas o más bajas; estas dosificaciones están comprendidas dentro del alcance de la presente invención.

Se puede mencionar que el término formulación o composición se pueden usar indistintamente.

Los ejemplos que siguen describen la preparación de ciertas formulaciones según la invención. Estos ejemplos son no limitantes, y simplemente ilustran la presente invención.

EJEMPLO 1

- 15 Se realizaron pruebas contra leishmaniasis cutánea usando el modelo experimental de infección de ratones BALB/c con *Leishmania amazonensis*.

Formulaciones:

Se preparan formulaciones usando técnicas bien conocidas por un experto en la técnica.

a) Dronedarona

Formulación 5	Dronedarona	gel acuoso, [Dronedarona] = 10 %, en vial de 20 g
Formulación 6	Dronedarona	fórmula cerosa hidrófila semisólida, [Dronedarona] = 10 %, en vial de 20 g
Formulación 7	Dronedarona	emulsión de aceite en agua, [Dronedarona] = 10 %, en vial de 20 g

20

Las formulaciones 5, 6 y 7 se detallan a continuación:

Formulación 5 (gel hidroalcohólico = gel acuoso)	%
tampón citrato 0,5 M pH 4,0	44
Etanol	44
HPMC	2
dronedarona	10 (base eq.)

Formulación 6 (cerosa hidrófila semisólida)	%
Lauroilpolioxilglicéridos (Gelucire 44/14)	75
Propilenglicol	15
dronedarona	10 (base eq.)

Formulación 7 (emulsión de aceite en agua *)	%
Base auto-emulsionante aniónica basada en derivados de palmitoestearato (SEDEFOS 75)	8,1
Aceite de soja	22,5
Glicerina	59,4
dronedarona	10 (base eq.)
* El agua se sustituye por un excipiente hidrófilo. Así, la emulsión está constituida por gotitas de aceite dispersado en una matriz hidrófila.	

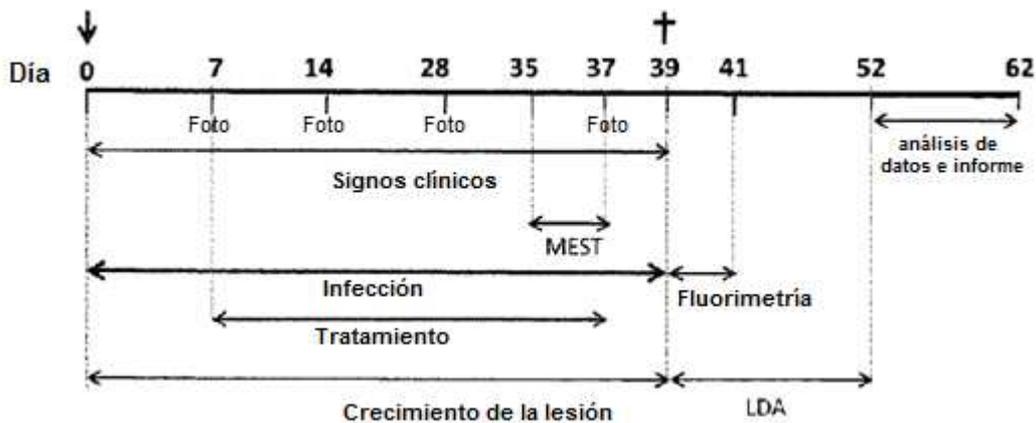
b) Formulaciones de control de Glucantime:

- Formulación de glucantime-PBS N° 8: formulación inyectable de Glucantime mezclado con PBS estéril (20 mg / mL), almacenado a 4 °C.

5 Esta preparación es equivalente a Glucantime® comercial, identificado por la OMS como un tratamiento de primera intención para leishmaniosis cutánea.

Procedimientos

a) Cronologías del protocolo:



10 b) Infección

Se infectaron ratones a 8 semanas de edad con 10 µL de 10⁶ promastigotes en el pabellón auditivo de la oreja derecha bajo anestesia ligera con éter.

c) Crecimiento de la lesión

15 Se midieron los espesores de la oreja contralateral infectada y no infectada cada 3-4 días con un compás calibrador, y se expresaron los tamaños de lesión como la diferencia entre el espesor de orejas infectadas y no infectadas.

d) Tratamiento con glucantime intralesional y dronedarona tópica

En el día 7 de infección, se separaron aleatorizadamente los animales en 5 animales / jaula para ratones (1 grupo de animales para cada formulación de dronedarona o Glucantime). Otro grupo infectado fue solo para seguimiento por inyección.

20 **i) Tratamiento tópico:** Se trataron orejas infectadas con aproximadamente 20 mg de la formulación tópica de dronedarona apropiada una vez al día durante 30 días. Se recogieron las formulaciones de su recipiente original con la punta de una espátula de plástico desechable, y se extendieron en el lado interno del pabellón auditivo infectado con un masaje de 10 segundos usando la misma espátula:

25 **ii) Tratamiento intralesional:** Se inyectaron s.c. orejas infectadas en el lado interno de la oreja con 10 µL de PBS que contenía 200 µg de Glucantime en polvo, dos veces a la semana desde los días 7 hasta 37 de infección (8 dosis):

e) Sensibilización cutánea (MEST):

5 El ensayo de hinchazón de la oreja de ratón (MEST) puede detectar de forma fiable sensibilizadores de moderados a fuertes, como se indica por las pautas de la OECD para ensayar productos químicos. En el día 34 de infección, se trataron las orejas no infectadas contralaterales (expuestas) con la formulación de dronedarona correspondiente. Se midió la hinchazón de la oreja en diversos momentos después de la exposición (0 h, 1 h, 5 h, 24 h, 48 h y 72 h).

f) Signos clínicos:

10 Se pesaron los animales en los días 0 de infección y en periodos semanales, posteriormente. Se observaron diariamente los animales, para signos de morbilidad y muerte. Se registraron los signos clínicos anormales durante estas revisiones rutinarias. Se registraron las observaciones clínicas que incluyen mortalidad, monitorización de convulsiones, apatía, sueño, coma, salivación, diarrea, examen en el laboratorio, color de piel, pelaje, ojos y membrana mucosa, actividad motora espontánea y voluntaria, y autopsia - en caso de que muera el animal. También se registró cualquier aspecto poco usual de las lesiones tratadas, tales como vesículas, ulceración completa, costra, oscurecimiento, según las directrices internacionales (OMS / OECD).

g) Fotografías

15 Se hicieron fotografías de las orejas infectadas (tratadas y no tratadas) con una cámara digital a intervalos semanales.

h) Carga de parásitos por ensayo de dilución limitante (LDA)

20 En el día 39 de infección, se sacrificaron los animales con anestesia y se limpiaron asépticamente las orejas infectadas con etanol yodado, seguido por etanol solo. Se cortaron las orejas a lo largo de su base y se pesaron asépticamente. Entonces se cortaron individualmente en trozos, y se prepararon suspensiones de células individuales en PBS que contenían antibióticos (1 mL / oreja) usando una malla de acero inoxidable (Sigma). Se pipetearon suavemente arriba y abajo 8x los tejidos tamizados para la disociación de células. Se diluyeron previamente 500x las suspensiones de células en medio M199 complementado con 10 % de suero de ternero fetal inactivado por calor, antibióticos 100 U/mL de penicilina / 100 µg/mL de estreptomina, 5 µg/mL de hemina y 2 % de orina humana), y luego se diluyeron en serie 3 veces (50 µL + 100 µL) por triplicado en microplacas de fondo plano durante un total de 24 diluciones. Se incubaron las microplacas a 26 °C en una estufa de incubación BOD humidificada. Se comprobaron los pocillos cada 3-4 días para la presencia de promastigotes durante hasta 20 días. Se calculó el número de parásitos en cada oreja infectada según la masa de tejido y conteniendo teóricamente la última dilución 1 amastigote de tejido.

30 Resultados sobre la eficacia de las formulaciones de dronedarona:

35 **Dronedarona: Crecimiento de lesiones:** La formulación N° 5 (gel acuoso) fue muy eficaz durante todo el tratamiento, próxima al tratamiento de referencia N° 8 (Glucantime intralesional) (Fig. 9). Las formulaciones N° 6 (semisólido ceroso hidrófilo) y N° 7 (emulsión o/w) indujeron elevados tamaños de lesión. Esto fue debido a la irritación de la piel (véase MEST, Fig. 11), no al crecimiento promovido de parásitos (véase la Fig. 10). Además, la suspensión de los tratamientos N° 6 y N° 7 en el día 32 condujo a la rápida disminución de los espesores de oreja: después:

CRECIMIENTO DE LESIONES - Formulaciones de dronedarona

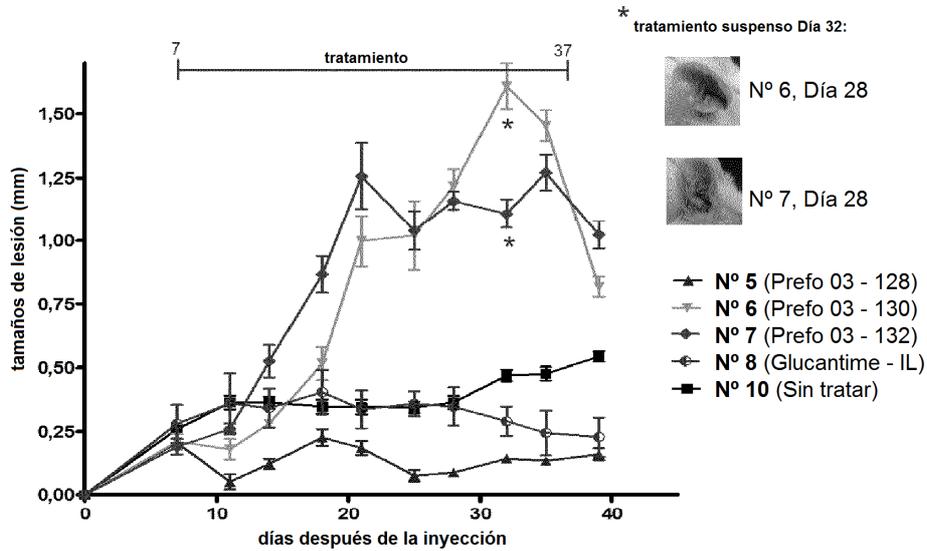


Figura 9: Crecimiento de lesiones en ratones tratados con dronedarona. Se infectaron ratones en el Día 0. El tratamiento diario tópico empezó en el Día 7 y continuó hasta el Día 37 con todas las formulaciones de dronedarona indicadas, excepto para los grupos Nº 6 y Nº 7 en los que se suspendió el tratamiento en el Día 32 debido a toxicidad (irritación de la piel). Se midieron los tamaños de las lesiones en los tiempos indicados (n=5).

Dronedarona: Cargas de parásitos en la oreja. En el Día 39 de infección (30 días de tratamiento), las cargas de parásitos en las orejas fueron significativamente más bajas en el grupo tratado por vía tópica con Nº 5 (gel acuoso). Las formulaciones Nº 6 (semisólido ceroso hidrófilo) y Nº 7 (emulsión o/w) no alteraron las cargas de parásitos (Fig. 10):

5

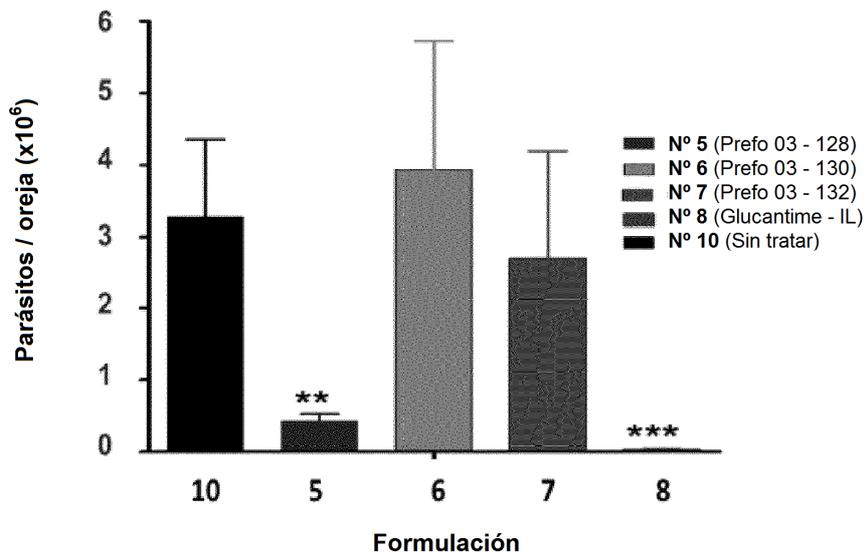


Figura 10: Cargas de parásitos en ratones tratados con dronedarona. En el día 39 de infección, se determinaron las cargas de parásitos en las orejas de ratones tratados con las formulaciones indicadas como para la Fig. 9 por el ensayo de dilución limitante. Media ± DE (n=5). ** p<0,005, *** p<0,001

Conclusiones

5 La formulación 5 fue la más prometedora en el control del crecimiento de lesiones durante toda la infección, la baja carga de parásitos al final del experimento fue compatible con el crecimiento controlado de lesiones, similar al logrado con 8 dosis de 200 µg de Glucantime intralesional. Los animales parecieron felices durante todo el tratamiento, normalmente engordaron y no generaron sensibilidad cutánea tras la exposición.

EJEMPLO 2**Estudio *in vitro* de la eficacia de dronedarona sobre una cepa de *Leishmania amazonensis*, en comparación con los tratamientos de referencia antimonio de meglumina, miltefosina y anfotericina B en condiciones de laboratorio similares**

10 Se usó una cepa de *Leishmania amazonensis* (MHOM / BR / 73 / M2269). Se suministraron clorhidrato de dronedarona y antimonio de meglumina por Sanofi. Se compraron anfotericina B (desoxicolato) y miltefosina de Sigma-Aldrich.

El estudio se refirió a dos modelos celulares:

- 1/ Amastigotes axénicos de *L. amazonensis* (parásitos aislados)
- 15 - 2/ Amastigotes intramacrofágicos de *L. amazonensis* (parásitos alojados en macrófagos, como se encuentran en la dermis, durante la infección por leishmaniosis cutánea).

20 El primer modelo celular que se cultiva en un medio basado en M199 permite definir la actividad intrínseca de una sustancia sobre el propio parásito mientras que el segundo modelo celular integra la capacidad de la sustancia para atravesar la membrana del macrófago y la del fagolisosoma. Los macrófagos usados son células RAW 264.7, que se cultivan en medio basado en DMEM con 10 % de suero fetal de ternera.

- Determinación de CI50 de cada una de las moléculas

25 Se prepararon disoluciones de dronedarona en DMSO, antimonio de meglumina y miltefosina en agua, y anfotericina B en una disolución isotónica de glucosa (G5) antes de cada experimento. Las evaluaciones *in vitro* fueron el objeto de tres experimentos independientes por duplicado. Los ensayos se realizaron cuantificando el ADN parasítico con SYBRGREEN como se describe por Audisio et al. (Eur. J. Med. Chem., 52: 44-50, 2012), así como por qPCR para amastigotes intramacrofágicos con amplificación de la alfa-tubulina del parásito. Los resultados obtenidos con ambos métodos son similares.

30 Se determinó la concentración de inhibición del 50 % de crecimiento de parásitos (CI50) después de 72 horas de contacto con dronedarona en comparación con antimonio de meglumina, miltefosina y anfotericina B, usados como productos de referencia.

En amastigotes axénicos (condiciones de ensayo 1/), la dronedarona tiene una CI50 de $0,34 \pm 0,06 \mu\text{M}$, mientras que el antimonio de meglumina tiene una CI50 de $908 \pm 159 \mu\text{M}$, miltefosina a CI50 de $0,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ y anfotericina B a CI50 de $0,031 \pm 0,002 \mu\text{M}$.

35 En amastigotes intramacrofágicos (condiciones de ensayo 2/), la dronedarona tiene una CI50 de $0,50 \pm 0,22 \mu\text{M}$, mientras que el antimonio de meglumina tiene una CI50 de $133,63 \pm 10,41 \mu\text{M}$, miltefosina a CI50 de $1,87 \pm 0,032 \mu\text{M}$ y anfotericina B a CI50 de $0,047 \pm 0,005 \mu\text{M}$.

- Evaluación de la posible toxicidad de dronedarona sobre células hospedadoras humanas (macrófagos) en comparación con los fármacos de referencia.

Estudio de la citotoxicidad sobre macrófagos (células RAW 264.7)

40 Se determinó la máxima concentración no tóxica (CMA) por la técnica de azul tripano según el método descrito en Audisio y al. (Eur. J. Med. Chem., 52: 44-50, 2012).

La CMA de la dronedarona es $12,5 \mu\text{M}$

La CMA del antimonio de meglumina es $> 200 \mu\text{M}$.

La CMA de la anfotericina B es $6,25 \mu\text{M}$

45 La CMA de la miltefosina es $50 \mu\text{M}$

Entonces, la toxicidad de la dronedarona sobre los macrófagos de la dermis es inferior a la mayoría de los fármacos de referencia, y no impedirá su uso terapéutico para leishmaniosis cutánea.

- Estudio de la asociación de dronedarona con antimonio de meglumina, miltefosina y anfotericina B

Se estudió la asociación de dronedarona con cada uno de los productos de referencia según el método descrito por Odds y al., J. Antimicrob. Chemother., 52:1, 2003, para identificar una acción sinérgica o aditiva o antagonista. El estudio comprendió tres experimentos independientes que permitieron el cálculo del índice de concentración inhibidora fraccionaria (FICI):

- 5 - Si $FICI < 0,5$: Sinergia
- Si $0,5 < FICI < 4$: Efecto aditivo, ninguna interacción
- Si $FICI > 4$: Antagonismo
- Interacción entre dronedarona y antimonio de meglumina:

En amastigotes axénicos, $FICI = 0,27$. Se obtuvo un efecto sinérgico entre dronedarona y antimonio de meglumina.

- 10 En amastigotes intramacrofágicos, $FICI = 0,79$. Se obtuvo un efecto aditivo entre dronedarona y antimonio de meglumina.

- Interacción entre la dronedarona y la miltefosina:

En amastigotes axénicos, $FICI = 0,39$. Se obtuvo una sinergia entre dronedarona y miltefosina.

En amastigotes intramacrofágicos, $FICI = 0,46$. Se obtuvo una sinergia entre dronedarona y miltefosina.

- 15 - Interacción entre dronedarona y anfotericina B:

En amastigotes axénicos, $FICI = 0,63$. Se obtuvo un efecto aditivo entre dronedarona y anfotericina B.

En amastigotes intramacrofágicos, $FICI = 0,54$. Se obtuvo un efecto aditivo entre dronedarona y anfotericina B.

Conclusiones

A/ Actividad de dronedarona sobre los parásitos, en comparación con fármacos de referencia:

- 20 La dronedarona presenta una fuerte actividad antileishmaniasis *in vitro* en ambos modelos, amastigotes axénicos y amastigotes intramacrofágicos de *Leishmania amazonensis*, con CI50 más baja dentro del intervalo micromolar, que lo sitúa entre la anfotericina B y la miltefosina, en términos de actividad. Así se mantiene la actividad intrínseca sobre el propio parásito cuando se protege en el fagolisosoma dentro del macrófago.

B/ Actividad de dronedarona sobre los parásitos, en asociación con fármacos de referencia:

- 25 La interacción de dronedarona con antimonio de meglumina o con anfotericina B es de tipo aditivo. No se demostró efecto antagonista, lo que sugiere que puede ser posible un uso concomitante de dronedarona con antimonio de meglumina o anfotericina B.

La interacción de dronedarona con miltefosina es de tipo sinérgico, que sugiere que puede ser de interés el uso concomitante de dronedarona con miltefosina, por ejemplo, para reducir las dosis administradas.

30 **EJEMPLO 3**

Estudio *in vitro* sobre cepas de *Leishmania amazonensis* resistentes a antimonio de meglumina (Glucantime®)

- 35 En las cepas de *Leishmania amazonensis* resistentes a antimonio de meglumina (CI50 = 200 mM) en forma de promastigote, la quimiosensibilidad a dronedarona es similar a la observada en cepas que no son resistentes a antimonio de meglumina (principio activo de Glucantime®).

Eso significa que el mecanismo de acción de la dronedarona sobre los parásitos se diferencia del de Glucantime. La dronedarona tiene el potencial de tratar cepas resistentes a Glucantime como se encuentra, por ejemplo, en América latina.

EJEMPLO 4

- 40 **Estudio *in vitro* sobre la formación de resistencia a dronedarona con el tiempo, usando cepa de *Leishmania amazonensis***

La prueba consiste en el cultivo a largo plazo de una cepa de *L. amazonensis* (forma de promastigote), en contacto con dosis crecientes de dronedarona, empezando con concentraciones iniciales más bajas que la CI50.

En momentos de tiempo regulares, se confirma la viabilidad y patogenicidad de parásitos, moviéndose el cultivo hacia amastigotes axénicos y amastigotes intramacrofágicos, y calculando la nueva concentración inhibidora para el 50 % de la población (CI50).

5 Después de seis meses de cultivo y exposición de los parásitos a dronedarona, no se observó modificación significativa de la concentración inhibidora (CI50).

Como referencia: una exposición similar de la cepa a Glucantime ha llevado a un aumento de CI50 x 200.

Aunque el estudio continuará durante un tiempo, ya se puede establecer que la molécula no genera una resistencia en parásitos expuestos.

EJEMPLO 5

10 **Estudio *in vitro* sobre *Leishmania donovani* y *Leishmania major***

Para evaluar la polivalencia de dronedarona como un tratamiento sobre las diversas cepas de *Leishmania* diseminadas en todo el mundo, con diversas sensibilidades conocidas a los fármacos de referencia, se completaron las pruebas previas con cepas consideradas representativas de las diversas zonas de endemia.

15 Se usaron cepas de *Leishmania donovani* (MHOM / ET / 67 / HU3) y *Leishmania major* (MHOM / SU / 73 / 5-ASKH) para este estudio.

Se suministraron clorhidrato de dronedarona y el antimonio de meglumina por Sanofi. La miltefosina se compró de Sigma-Aldrich.

El estudio *in vitro* se refirió a cuatro modelos celulares:

- 1/ Amastigotes axénicos de *L. donovani* y *L. major* (parásitos aislados)
- 20 - 2/ Amastigotes intramacrofágicos de *L. donovani* y *L. major* (parásitos alojados en macrófagos, como se encuentran en la dermis, durante la infección por leishmaniosis cutánea).

El modelo de amastigotes axénicos se cultiva en un medio basado en M199 y permite definir la actividad intrínseca de una sustancia sobre el propio parásito, mientras que el modelo de amastigotes intramacrofágicos integra la capacidad de la sustancia para atravesar la membrana del macrófago y la del fagolisosoma.

25 Los macrófagos usados son células RAW 264.7, que se cultivan en un medio basado en DMEM con 10 % de suero fetal de ternera.

Determinación de CI50 de dronedarona, Glucantime® y de miltefosina:

Se prepararon disoluciones de dronedarona en DMSO, antimonio de meglumina y miltefosina en agua antes de cada experimento. Las evaluaciones *in vitro* fueron el objeto de tres experimentos independientes.

30 Los ensayos se realizaron cuantificando el ADN parasítico con SYBRGREEN como se describe por Audisio et al. (Eur. J. Med. Chem., 52: 44-50, 2012).

Se determinó la concentración de inhibición del 50 % de crecimiento de parásitos (CI50) después de 72 horas de contacto con dronedarona en comparación con antimonio de meglumina y miltefosina, usados como productos de referencia.

- 35 - En amastigotes axénicos de *L. donovani*, la dronedarona tiene una CI50 de $47,38 \pm 6,27 \mu\text{M}$, mientras que el antimonio de meglumina tiene una CI50 $> 1000 \mu\text{M}$, y la miltefosina una CI50 de $13,0 \pm 1,25 \mu\text{M}$.
- En amastigotes axénicos de *L. major*, la dronedarona tiene una CI50 de $2,55 \pm 0,51 \mu\text{M}$, mientras que el antimonio de meglumina tiene una CI50 $> 1000 \mu\text{M}$, y la miltefosina una CI50 de $5,57 \pm 1,50 \mu\text{M}$.
- 40 - En los amastigotes intramacrofágicos de *L. donovani*, la dronedarona tiene una CI50 de $1,67 \pm 0,10 \mu\text{M}$, mientras que el antimonio de meglumina tiene una CI50 de $390,36 \pm 40,46 \mu\text{M}$, y la miltefosina una CI50 de $0,88 \pm 0,10 \mu\text{M}$.
- En amastigotes intramacrofágicos de *L. major*, la dronedarona tiene una CI50 de $1,32 \pm 0,12 \mu\text{M}$, mientras que el antimonio de meglumina tiene una CI50 de $347,98 \pm 79,87 \mu\text{M}$, y la miltefosina una CI50 de $0,72 \pm 0,11 \mu\text{M}$.

45 Además, la dronedarona no presenta toxicidad para los macrófagos a la concentración de $12,5 \mu\text{M}$. Su concentración citotóxica al 50 % (CC50) es así superior a $12,5$.

Conclusiones

1- Actividad *in vitro* de dronedarona en *Leishmania donovani* (como modelo de cepas indias/africanas)

5 La dronedarona presenta una fuerte actividad sobre amastigotes intramacrofágicos de *L. donovani* similar a la de miltefosina, del orden de 1-2 μM , aunque es débilmente activa en amastigotes axénicos. El índice terapéutico de la dronedarona definido como CC50 en amastigotes intramacrofágicos de *L. donovani* / CI50 es así superior a 7.

2- Actividad *in vitro* de dronedarona en *Leishmania major* (como un modelo de cepas de Oriente Medio)

10 La dronedarona presenta una fuerte actividad *in vitro* sobre los modelos de amastigotes axénicos y amastigotes intramacrofágicos de *Leishmania major*, con CI50 inferior a 3 μM , que lo sitúa a un nivel de actividad similar al de la miltefosina. La actividad intrínseca sobre el propio parásito es así mantenida cuando este se protege en el fagolisosoma dentro del macrófago. El índice terapéutico de la dronedarona definido como CC50 en amastigotes intramacrofágicos de *L. major* / CI50 es así superior a 9.

Estos resultados tienden a demostrar que la dronedarona tiene una capacidad de provocar un efecto terapéutico sobre diversas cepas (3 modelos probados en todo el mundo), a concentraciones similares a miltefosina, y mucho más bajo que la glucantime.

15

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n que comprende dronedarona o una de sus sales farmac3uticamente aceptables para administraci3n t3pica, en donde dicha formulaci3n es un gel hidroalcoh3lico, para su uso en el tratamiento de leishmaniasis.
- 5 2. Formulaci3n para su uso seg3n la reivindicaci3n 1, en donde dicha formulaci3n comprende al menos un excipiente farmac3uticamente aceptable.
3. Formulaci3n para su uso seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha sal farmac3uticamente aceptable es clorhidrato de dronedarona.
4. Formulaci3n para su uso seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho excipiente farmac3uticamente aceptable es hidroxipropilmetilcelulosa.
- 10 5. Formulaci3n seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de leishmaniasis cut3nea.
6. Formulaci3n seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento de leishmaniasis generada de cepas de *Leishmania amazonensis*.
- 15 7. Formulaci3n seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento de leishmaniasis generada de cepas de *Leishmania amazonensis* resistentes a antimonio de meglumina.
8. Formulaci3n seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento de leishmaniasis generada de *Leishmania donovani*.
9. Formulaci3n seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento de leishmaniasis generada de *Leishmania major*.
- 20 10. Formulaci3n para su uso seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la dronedarona o una de sus sales farmac3uticamente aceptables se usa en una proporci3n de 10 % en peso de principio activo en forma de base.