

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 928**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 25/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2012 PCT/EP2012/070704**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13057222**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2012 E 12783158 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2768513**

54 Título: **Uso de derivado de avermectina para aumentar la biodisponibilidad y eficacia de lactonas macrocíclicas**

30 Prioridad:

18.10.2011 EP 11306348

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

06.08.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR
L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET
L'ENVIRONNEMENT (50.0%)**

147, rue de l'Université

75338 Paris Cedex 07, FR y

**THE ROYAL INSTITUTION FOR THE
ADVANCEMENT OF LEARNING/MCGILL
UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

LESPINE, ANNE;

PRICHARD, ROGER y

MENEZ, CÉCILE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 777 928 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

Uso de derivado de avermectina para aumentar la biodisponibilidad y eficacia de lactonas macrocíclicas

5 La presente invención se refiere al uso de derivado de avermectina en asociación con lactonas macrocíclicas como formulación para el tratamiento de infecciones parasitarias.

10 Las infecciones parasitarias son las enfermedades más frecuentes para el ganado o los animales domésticos. A pesar de los recientes avances en investigación farmacéutica veterinaria, siempre es necesario encontrar un fármaco o formulación más eficiente y seguro para combatir infecciones parasitarias. Para humanos, las infecciones parasitarias como oncocercosis causada por infección por *Onchocerca volvulus*, la filariasis linfática causada por *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* y *Brugia timori*, o enfermedades parasitarias tropicales son aún enfermedades frecuentes en países en vías de desarrollo. Del mismo modo, aunque son endémicas en algunos países en vías de desarrollo, la estrongiloidiasis intestinal y las enfermedades parasitarias cutáneas también suponen una amenaza para el mundo desarrollado.

15 Las lactonas macrocíclicas (LM) son una familia de fármacos antiparasitarios de amplio espectro que se desarrollaron a principios de los años 80 y se han utilizado ampliamente para el tratamiento de parásitos tanto internos como externos en mascotas, en ganado y en humanos. Las LM también son eficaces para tratar enfermedades parasitarias causadas por cepas de nematodos resistentes a benzimidazol, levamisol y pirantel.

20 Las LM son una familia de compuestos aislados a partir de microorganismos del suelo que pertenecen al género *Streptomyces*. Las lactonas macrocíclicas comprenden avermectinas y milbemicinas. Las avermectinas comprenden ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina o selamectina, mientras que las milbemicinas comprenden moxidectina, nemadectina y milbemicina oxima.

25 La acción principal de las LM de nematodos parasitarios es aumentar la permeabilidad de membrana a iones de cloruro mediante la interacción con la subunidad de canal de cloruro activado por glutamato. Las actividades agonistas de glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA) de las LM son los mecanismos que conducen a la parálisis y muerte de los parásitos tratados a concentración nanomolar. De hecho, las LM mantienen abiertos los canales activados por glutamato que bloquean el bombeo faríngeo e inhibe la alimentación, que es uno de los efectos que causan la muerte del parásito. Del mismo modo, la ivermectina conduce también a la activación y parálisis del músculo corporal en *Haemonchus contortus* (Sheriff *et al.*, *Vet. Parasitol.*, 2005, 128(3-4), 341-346), e inhibe la reproducción de gusanos en *Onchocerca volvulus* (Schulz-Key, *Acta Leiden*, 1990, 59(1-2), 27-44).

30 Sin embargo, en los últimos años, se ha observado una resistencia generalizada de LM en algunos parásitos nematodos de ovinos, caprinos y bovinos. La causa y mecanismo de la resistencia de LM aún no se comprenden completamente, pero investigaciones recientes han mostrado que los transportadores de MDR (resistencia a múltiples fármacos) son un grupo de proteínas implicadas en la resistencia de LM. Los transportadores de MDR son proteínas de membrana que pertenecen a la familia de ABC (transportadores dependientes de ATP), y cuya función principal es el transporte dependiente de ATP de un número de compuestos exógenos estructuralmente no relacionados. Debido a su expresión en la membrana plasmática, funcionan como una barrera de permeabilidad para el paso de xenobiótico a través de la membrana celular expulsándolos activamente fuera de las células. Los transportadores de MDR se han considerado como una de las causas de restricción de la eficacia de la quimioterapia, cuando las células tumorales sobreexpresan estos transportadores. Los transportadores de MDR también limitan la entrada de LM en el organismo diana humano y afectan a la eficiencia de LM como antiparasitario. Además, la expresión de transportadores de MDR en intestino, hígado y riñón les permite desintoxicar estos tejidos y, finalmente, eliminar los fármacos sustratos fuera de la circulación sistémica, ejerciendo una acción protectora contra su toxicidad, así como limitando su eficacia terapéutica.

35 La glucoproteína-P (Pgp), localizada en la membrana apical, es uno de los transportadores de MDR. La función principal de Pgp es la expulsión activa de diversos compuestos exógenos estructuralmente no relacionados para proteger tanto a los organismos vertebrados como a los invertebrados contra moléculas potencialmente tóxicas. La Pgp puede transportar su sustrato desde el lado basolateral hasta el lado apical del epitelio y la endotelio. La Pgp desempeña también un papel importante en la barrera hematoencefálica, dado que puede limitar la concentración de xenobióticos en el cerebro. La sobreexpresión de Pgp es una de las causas de resistencia a fármacos observada durante el tratamiento con avermectina para infecciones parasitarias o alguna quimioterapia tumoral.

40 Más tarde, también se descubren otras proteínas resistentes a múltiples fármacos MRP1, 2 y 3 (ABCC1, 2 y 3). También están implicadas en la resistencia a múltiples fármacos y proporcionan actividades complementarias y superpuestas como bombas de expulsión de fármacos multispecíficas.

45 La proteína de resistencia de cáncer de mama más recientemente descubierta es ABCG2, que ayuda a la Pgp a prevenir que material no deseado en la circulación pase al cerebro. Los homólogos de los transportadores de MDR existen también en el parásito, y la selección y/o modulación de expresión de su gen podría ser una de las razones de la resistencia del parásito a LM. En los últimos años se han desarrollado diferentes métodos para superar la restricción

- de efectividad debido a las bombas de expulsión de fármacos administrados. Uno de ellos es el uso de inhibidores de transportadores de MDR, que pueden bloquear bombas de expulsión de fármacos administrados para mejorar la concentración intracelular de ingrediente activo. Se ha informado de algunos ligandos de Pgp en el pasado, como ciclosporina A, su derivado PSC833 (valsopodar®), el fármaco opioide antidiarreico loperamida, o verapamilo. Sin embargo, desafortunadamente, hasta hoy en día, debido a la toxicidad importante de estos inhibidores de transportadores de MDR, ninguno de ellos puede aplicarse en uso farmacéutico.
- Se han observado en primer lugar LM como sustratos de transportadores de MDR. Más tarde, se encontró que LM, en particular la ivermectina, también son inhibidores de transportadores de MDR.
- A pesar del hecho de que la ivermectina puede inhibir eficientemente los transportadores de MDR, no puede convertirse en un fármaco candidato, debido a su importante neurotoxicidad si penetra en el cerebro a alta concentración. De hecho, la ivermectina interactúa con receptores GABA, un complejo situado en el sistema nervioso. La función anormal de los receptores GABA puede conducir a trastornos neurológicos, mentales, vegetotrópicos, somáticos, hormonales y otros. Dado que la inhibición de transportadores de MDR sigue siendo el método más prometedor para restringir la resistencia a quimioterapia; y la lactona macrocíclica siguen siendo moléculas clave para tratar infecciones parasitarias, es necesario y urgente encontrar nuevos inhibidores seguros y eficientes de transportadores de MDR.
- J. C. Sheriff *et al.*, *Parasitology* (2002), 125, págs. 477-484 se refiere a los efectos de antihelmínticos macrocíclicos sobre la alimentación y el bombeo faríngeo en *Trichostrongylus colubriformis in vitro*.
- A. Lespine *et al.*, *Trends in Parasitology*, vol. 24, n.º 7, págs. 293-298 se refiere a la modulación de transportador de ABC como una estrategia para mejorar la actividad de antihelmínticos de lactona macrocíclica.
- A. Lespine *et al.*, *Chemico-Biological Interactions* 159 (2006), págs. 169-179 se refiere a la interacción de ivermectina con proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP1, 2 y 3).
- W.L. Shoop *et al.*, *International Journal for Parasitology*, vol. 25, n.º 8, págs. 923-927, 1995 se refiere a avermectinas y milbemicinas contra *Fasciola hepática* con respecto a la eficacia de resistencia *in vivo* y a la unión a receptor *in vitro*.
- M. Jani *et al.*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 100, n.º 1, 2011 se refiere a la interacción de ivermectina con ABCG2 humana.
- El documento WO 01/70028 se refiere a una composición activa para controlar o erradicar plagas de dípteros en animales domésticos o sus entornos, que comprende una combinación sinérgica de al menos un compuesto A83543 y al menos una lactona macrocíclica.
- El documento EP 1632 498 se refiere a avermectina, monosacárido de avermectina y aglicona de avermectina como compuestos que tienen propiedades pesticidas.
- S.M. Asio *et al.*, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (2009), 103, págs. 274-279 se refiere a un ensayo aleatorizado y doble ciego presentado de ivermectina sola y en combinación con albendazol para el tratamiento de las infecciones por *Mansonella perstans* en Uganda.
- S. Townson *et al.*, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (1990), 84, págs. 411-416 se refiere a los efectos de ivermectina utilizada en combinación con otros fármacos antiparasitarios conocidos en *Onchocerca gutturosa* adulto y *O. volvulus in vitro*.
- S. Furusawa *et al.*, *Pharm. Pharmacol. Commun.* 2000, 6, págs. 129-134 se refiere a la potenciación de la apoptosis inducida por doxorubicina de células de leucemia de ratón resistente por ivermectina.
- S.-S. Pong *et al.*, *Journal of Neurochemistry* 1980, 34(2), págs. 351-358 se refiere a estudios sobre el mecanismo de acción de avermectina B_{1a} con respecto a la estimulación de liberación de ácido γ -aminobutírico de sinaptosomas cerebrales.
- A.C. Kotze, *J. Parasitol.* 84(3), 1998, págs. 631-635 se refiere a efectos de lactonas macrocíclicas sobre la ingestión en larvas de *Haemonchus contortus* sensibles y resistentes.
- G.R. Dawson *et al.*, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2000, vol. 295, n.º 3 describe que los efectos adversos y anticonvulsivos de análogos de avermectina en ratones se median por medio del receptor de ácido γ -aminobutírico.
- Y. Deng *et al.*, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 43, págs. 116-122 (1992) se refiere al canal de cloruro activado del GABA con cabeza de mosca doméstica en lo que respecta al sitio de unión toxicológicamente relevante para avermectinas acopladas al sitio para etilnilbicioortobenzoato.

W.L. Shoop *et al.*, International Journal for Parasitology, vol. 26, n.º 11, págs. 1227-1235, 1996 se refiere a la eficacia en ovinos y farmacocinética en bovinos que condujo a la selección de eprinomectina como endectocida tópico para bovinos.

5 B.J. Banks *et al.*, Bioorganic and Medicinal Chemistry 8 (2000), págs. de 2017 a 2025 se refiere a avermectinas y control de pulgas en lo que respecta a relaciones de actividad de estructura y la selección de selamectina para desarrollo como un endectocida para animales de compañía.

10 B. Michael *et al.*, J. Parasitol., 87(3), 2001, págs. 692-696 se refiere a la comparación de ivermectina, doramectina, selamectina y once intermediarios en un ensayo de desarrollo larval de nematodos.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un inhibidor de proteínas de resistencia a múltiples fármacos.

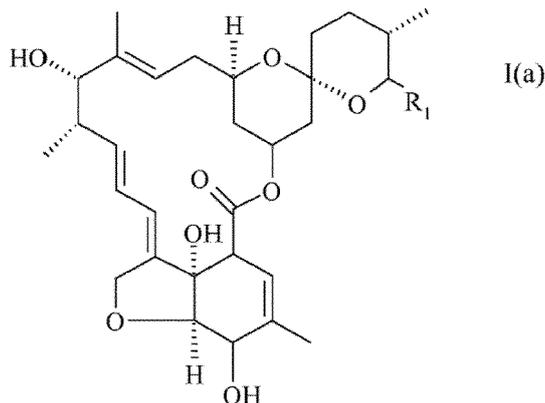
15 La presente invención se refiere a una composición que comprende:

- un compuesto de fórmula I, y

20 - un ingrediente activo elegido de un antiparasitario, un agente antitumoral, un agente antiviral, un agente antiepiléptico, un agente antibacteriano, en particular un antibiótico o un antifúngico,

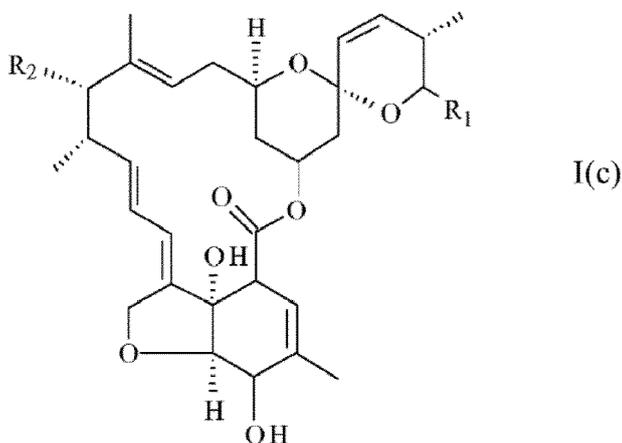
para su uso como medicamento en el tratamiento de infecciones parasitarias, infecciones virales, cánceres resistentes a quimioterapia, o epilepsia, infecciones bacterianas o infecciones fúngicas;

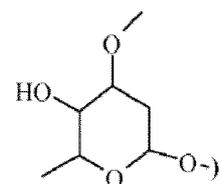
25 en la que el compuesto de fórmula I es un derivado de avermectina de fórmula I(a):



30 en la que R1 se elige del grupo constituido por $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ y $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$; o

en la que el compuesto de fórmula I es un derivado de avermectina de fórmula I(c):



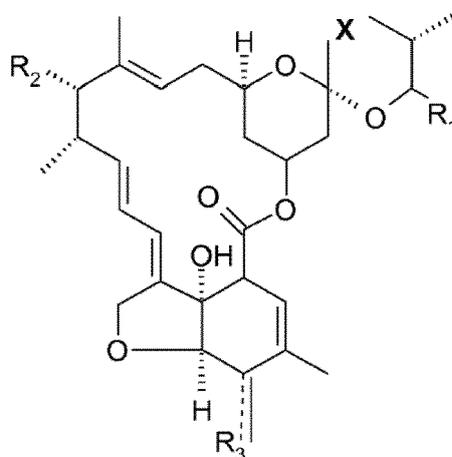


en la que R1 se elige del grupo constituido por $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ y $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$; y R2 es $-\text{OH}$ o

y en la que el compuesto de fórmula I(a) inhibe la proteína transportadora de casete de unión a ATP unido a la membrana (ABC) para mejorar la concentración intracelular del ingrediente activo para restablecer o mejorar la eficiencia del ingrediente activo.

Realizaciones de la presente invención se proporcionan en las reivindicaciones dependientes.

En general, la presente divulgación se refiere al uso de un compuesto derivado de avermectina de fórmula I

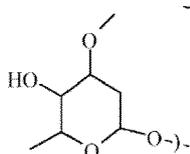


en la que:

(i) R1 se elige del grupo constituido por $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ o ciclohexilo,

(ii) X representa $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}=\text{CH}$,

(iii) R2 se elige del grupo constituido por



o grupo $-\text{OH}$,

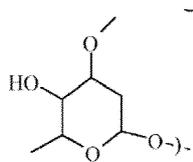
(iv) R3 es OH o NOH,

(v) ----- representa un enlace simple cuando R3 es OH, o un enlace doble cuando R3 es NOH,

como inhibidor de una proteína unida a membrana que transporta compuestos exógenos fuera de las células diana.

Cuando R2 representa un grupo $-\text{OH}$, el compuesto de fórmula I es una avermectina de aglicona.

Cuando R2 representa



el compuesto de fórmula I es un monosacárido de avermectina.

5 Los inventores de la presente invención han observado sorprendentemente que las avermectinas de aglicona o monosacárido de avermectinas exponen una potencia y eficiencia inhibitoria comparable con la de ivermectina o valsopodar®, el último es uno de los inhibidores de MDR más eficientes ya conocidos. Además, los inventores han observado que las avermectinas de aglicona o el monosacárido de avermectinas tienen una potencia inhibitoria mayor para la Pgp de nematodos que la que tienen para la Pgp murina. Esta particularidad permite que avermectina de aglicona o monosacárido de avermectinas se utilice como adyuvante para antiparasitario convencional, que sufren de una restricción de eficiencia debido a la bomba de expulsión por intermediario de la Pgp de parásito. Lo más sorprendente es que las avermectinas de aglicona o monosacárido de avermectinas exhiben un agonista débil para receptores GABA, lo que significa que las avermectinas de aglicona tienen una neurotoxicidad más débil en comparación con la avermectina, especialmente ivermectina.

15 “Una proteína unida a membrana que transporta compuestos exógenos fuera de células diana” puede ser una proteína transportadora de casete de unión a ATP unido a la membrana (ABC) que medie la expulsión celular de distintos fármacos o productos químicos de una amplia variedad de estructura y función. Particularmente, tal proteína unida a membrana puede ser P-glicoproteína (ABCB1), la familia de proteínas asociadas a resistencia de múltiples fármacos, incluyendo MRP1/ABCC1, MRP2, MRP2, o proteína resistente de cáncer de mama (ABCG2).

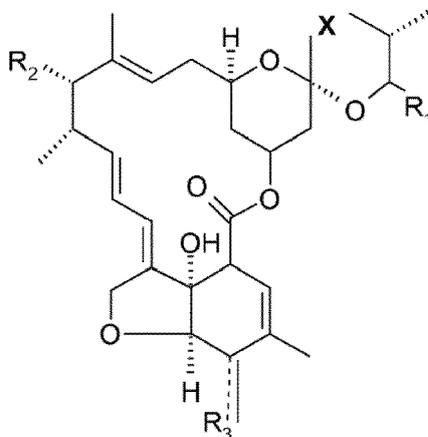
20 El inhibidor de tal proteína unida a membrana es un compuesto que puede unirse a dicha proteína unida a membrana y por tanto reducir la afinidad de dicho transportador unido a membrana con otro sustrato. La potencia inhibitoria de un inhibidor puede medirse según cualquier método convencional, tal como utilizando un sustrato fluorescente de referencia (ej.: rodamina 123 para Pgp) del transportador y midiendo la acumulación intracelular de este sustrato.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere al uso de un compuesto de fórmula I, como adyuvante para aumentar la biodisponibilidad de un ingrediente activo de un fármaco cuya expulsión fuera de células diana depende de una proteína unida a membrana que transporta compuestos exógenos fuera de células diana.

30 El término “adyuvante” se refiere a una molécula que no tiene potencia terapéutica cuando se administra sola, pero puede mejorar la potencia terapéutica de otra molécula cuando se administra simultáneamente con dicha otra molécula.

35 El compuesto derivado de avermectina de la presente divulgación, que inhibe eficientemente una proteína unida a membrana, en particular proteínas de ABC, permite mejorar la concentración intracelular del ingrediente activo de un fármaco, por consiguiente, para restaurar o mejorar la eficiencia de dicho fármaco.

Más particularmente, la presente divulgación está relacionada con compuestos derivados de avermectina de fórmula I:



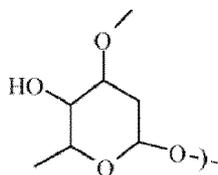
en la que:

45 (i) R1 se elige del grupo constituido por -CH(CH₃)₂, -CH(CH₃)CH₂CH₃ o ciclohexilo,

(ii) X representa $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}=\text{CH}$,

(iii) R_2 se elige del grupo constituido por

5



o grupo $-\text{OH}$,

10 (iv) R_3 es OH o NOH ,

(v) --- representa un enlace simple cuando R_3 es OH , o un enlace doble cuando R_3 es NOH , para su uso como un adyuvante de un fármaco.

15 La presente divulgación también se refiere a un compuesto derivado de avermectina de fórmula I para su uso anteriormente mencionado, en el que:

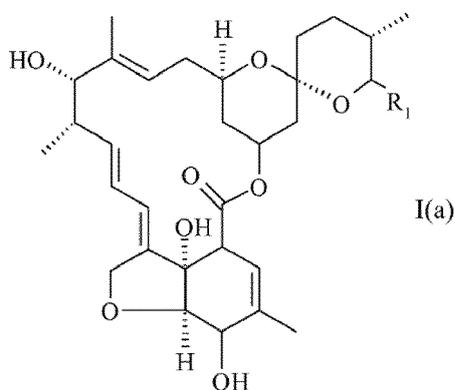
(i) R_1 se elige del grupo constituido por $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ y $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$,

20 (ii) X representa $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$,

(iii) R_2 es $-\text{OH}$,

(iv) --- R_3 es $-\text{OH}$, dicho compuesto correspondiente a ivermectina aglicona de fórmula I(a):

25



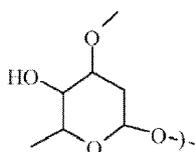
La presente divulgación también se refiere a un compuesto derivado de avermectina de fórmula I para su uso anteriormente mencionado, en el que:

30

(i) R_1 se elige del grupo constituido por $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ y $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$,

(ii) X representa $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$,

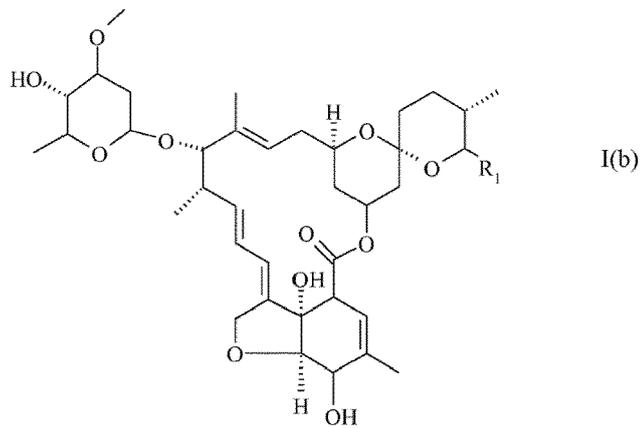
35 (iii) R_2 es



(iv) --- R_3 es $-\text{OH}$,

40

dicho compuesto correspondiente al monosacárido de ivermectina de fórmula I(b).



La presente divulgación también se refiere a un compuesto derivado de avermectina de fórmula I para su uso anteriormente mencionado, en el que:

5

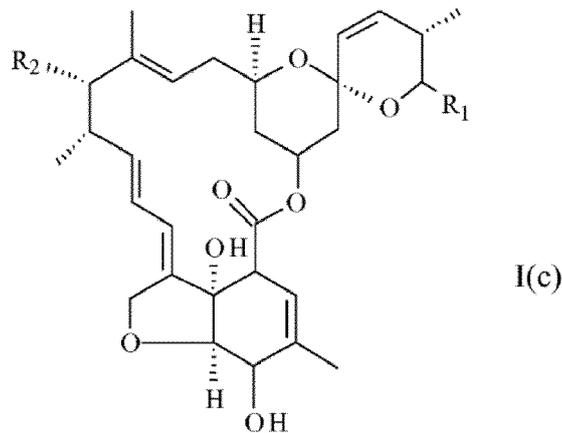
(i) R_1 se elige del grupo constituido por $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ y $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$,

(ii) X representa $-\text{CH}=\text{CH}-$,

10

(iii) R_2 es $-\text{OH}$,

(iv) $\text{---} R_3$ es $-\text{OH}$, dicho compuesto correspondiente a fórmula I(c):



15

Un compuesto de fórmula 1(c) puede ser aglicona de eprinomectina, monosacárido de eprinomectina, aglicona de emamectina, monosacárido de emamectina, aglicona de abamectina o monosacárido de abamectina.

20

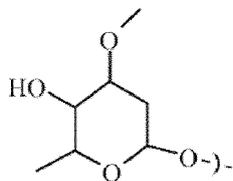
La presente divulgación también se refiere a un compuesto derivado de avermectina de fórmula I para su uso anteriormente mencionado, en el que:

(i) R_1 es ciclohexilo,

(ii) X representa $-\text{CH}=\text{CH}-$,

25

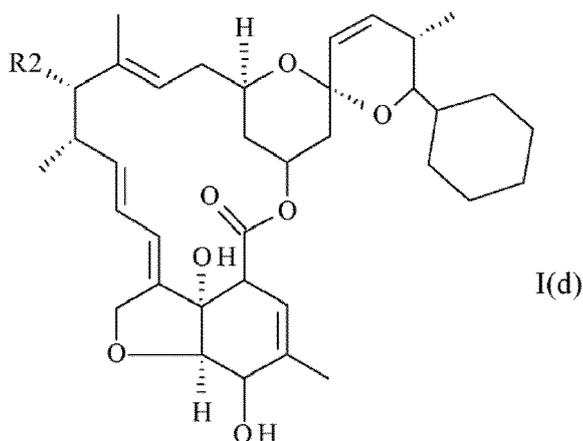
(iii) R_2 es $-\text{OH}$ o



30

(iv) $\text{---} R_3$ es $-\text{OH}$,

dicho compuesto corresponde al monosacárido de doramectina o aglicona de doramectina de fórmula I(d):

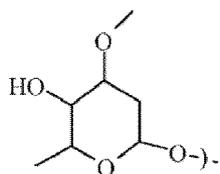


5 En otra realización particular, la invención se refiere a un compuesto derivado de avermectina de fórmula I para su uso anteriormente mencionado, en el que:

(i) R₁ es ciclohexilo,

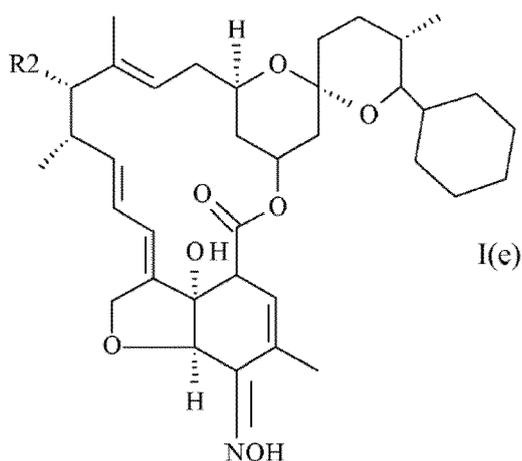
10 (ii) X representan -CH₂-CH₂-,

(iii) R₂ es -OH o



15

(iv)  R₃ es =NOH, dicho compuesto correspondiente a aglicona de selamectina o selamectina de fórmula I(e):



20 Según la invención, el compuesto derivado de avermectina de la presente invención se utiliza como adyuvante de un ingrediente activo elegido del grupo que comprende un antiparasitario, un agente antitumoral, un agente antiviral, un agente antiepiléptico, un agente antibacteriano, en particular un antibiótico, un antifúngico o cualquier compuesto que sea sustrato de dicha proteína unida a membrana.

25 Tal ingrediente activo puede ser cualquier ingrediente activo utilizado en un antiparasitario, agente antitumoral, agente antiviral o agente antiepiléptico conocido en la técnica.

En una realización particular, el antiparasitario se elige del grupo que comprende lactonas macrocíclicas, como las avermectinas, en particular ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina o selamectina, o las milbemicinas, en particular moxidectina, nemadectina o milbemicina oxima.

30

En otra realización particular, el agente antitumoral se elige del grupo que comprende:

- 5 - antibiótico antitumoral de tipo antraciclina, como daunorrubicina, doxorubicina, mitomicina C, mitoxantrona, adriamicina y actinomicina, o
- taxanos, como docetaxel, paclitaxel, o
- 10 - alcaloides, como vinblastina, vincristina, o
- epipodofilotoxinas, como etopósido, irinotecán, tenipósido y topotecan.

En otra realización particular, el agente antiviral se elige del grupo que comprende: inhibidores de proteasa del VIH-1, ritonavir, saquinavir, nelfinavir e indinavir e inhibidores no nucleósidos de retrotranscriptasa como efavirenz.

- 15 En otra realización particular, el agente antiepiléptico se elige del grupo que comprende: Fenobarbital (PB; 5-etil-5-fenil-2,4,6-trioxohexahidropirimidina), topiramato, lamotrigina fenitoína (PHT; 5,5-difenil-2,4-imidazolidinediona) y carbamazepina (CBZ; 5H-dibenzo [b,f]azepina-5-carboxamida).

- 20 En otra realización particular, el agente antibacteriano puede ser un antibiótico, como loperamida, monensina o los macrólidos.

En otra realización particular, el agente antifúngico se elige de un antifúngico azol, como itraconazol o ketoconazol.

- 25 Otro aspecto de la presente divulgación es proporcionar una composición que comprende un compuesto de fórmula I, en particular I(a), I(b), I(c), I(d) o I(e) para su uso como fármaco.

- 30 En particular, la presente divulgación se refiere a una composición que comprende un compuesto de fórmula I, en particular I(a), I(b), I(c), I(d) o I(e) para su uso como fármaco en el tratamiento de infecciones parasitarias, infecciones virales, cánceres resistentes a quimioterapia, epilepsia, infecciones bacterianas o infecciones fúngicas.

La presente divulgación se refiere también a una composición sinérgica que comprende:

- 35 - un compuesto de fórmula I, en particular 1(a), 1(b), 1(c), 1(d) o 1(e),
- un ingrediente activo elegido de antiparasitario, un agente antitumoral, un agente antiviral, un agente antiepiléptico, un agente antibacteriano, en particular un antibiótico o un agente antifúngico.

Más particularmente, la composición de la presente divulgación comprende:

- 40 - un compuesto de fórmula I, en particular I(a), I(b), I(c), I(d) o I(e), y
- 45 - un ingrediente activo elegido de un antiparasitario, un agente antitumoral, un agente antiantiviral, un agente antiepiléptico, un agente antibacteriano, en particular un antibiótico o un agente antifúngico, para su uso como fármaco en el tratamiento de infecciones parasitarias, infecciones virales, cánceres resistentes a quimioterapia, epilepsia, infecciones bacterianas o infecciones fúngicas.

La presente divulgación proporciona también una composición farmacéutica que comprende:

- 50 - un compuesto de fórmula I, en particular I(a), I(b), I(c), I(d) o I(e), y opcionalmente
- un ingrediente activo elegido de un antiparasitario, un agente antitumoral, un agente antiantiviral, un agente antiepiléptico, un agente antibacteriano, en particular un antibiótico o un agente antifúngico, y
- 55 - un portador farmacéuticamente aceptable.

Un portador farmacéuticamente aceptable puede ser cualquier portador farmacéuticamente aceptable convencional.

- 60 La composición farmacéutica según la presente divulgación puede utilizarse en el tratamiento de infecciones parasitarias, infecciones virales, cánceres resistentes a quimioterapia, epilepsia, infecciones bacterianas o infecciones fúngicas.

La composición farmacéutica según la presente divulgación puede administrarse por vía oral, inyección subcutánea, inyección intravenosa o inyección intratisular.

- 65 La composición farmacéutica según la presente divulgación puede administrarse con una dosis diaria de 0,01 mg/kg

a 0,5 mg/kg.

La presente divulgación se refiere también a un kit que es un producto que contiene

5 - un compuesto de fórmula I, y

- un ingrediente activo elegido de un antiparasitario, un agente antitumoral, un agente antiviral, un agente antiepiléptico, un agente antibacteriano, en particular un antibiótico o un agente antifúngico,

10 como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de infecciones parasitarias, infecciones virales, cánceres resistentes a quimioterapia, epilepsia, infecciones bacterianas o infecciones fúngicas.

15 La presente invención se ilustra en detalle mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, de cualquier manera, las figuras y los ejemplos no pueden considerarse como una limitación del alcance de la presente invención.

Figuras

20 Figura 1A: la figura 1A representa el perfil de HPLC de ivermectina y la ivermectina aglicona.

Figura 1B: la figura 1B representa el perfil de HPLC de ivermectina aglicona y monosacárido de ivermectina.

Figura 2: la figura 2 representa el perfil espectrométrico de masas de ivermectina aglicona.

25 Figura 3: la figura 3 compara la concentración efectiva máxima de Valspodar® a 5 μ M (VSP, columna gris), ivermectina a 5 μ M (IVM, columna blanca) e ivermectina aglicona a 10 μ M (Agli IVM, columna negra) en células LLC-PK1 transfectadas con Pgp murina. Se incuban células en un tampón que contiene rodamina 123 con o sin concentraciones crecientes de fármacos y se determinó fluorescencia intracelular. El eje Y representa la fluorescencia intracelular expresada como porcentaje del valor de control (célula incubada sin fármacos). Véase también el ejemplo 2.2.

30 Figura 4A: la figura 4A compara la inhibición de Pgp murina por ivermectina (cuadrado abierto) con la de la ivermectina aglicona (cuadrado negro) en LLC-PK1-mdrla. El eje X representa la concentración de ivermectina o ivermectina aglicona. El eje Y representa la acumulación de rodamina intracelular en comparación con el valor de control. Véase también el ejemplo 2.3.

35 Figura 4B: la figura 4B compara la inhibición de Pgp de nematodos (HcPgpA) por ivermectina (cuadrado abierto) con la de ivermectina aglicona (cuadrado negro) en LLC-PK1-HCPGPA. El eje X representa la concentración de ivermectina o ivermectina aglicona. El eje Y representa la acumulación de rodamina intracelular en comparación con el valor de control. Véase también el ejemplo 2.3.

40 Figura 5: la figura 5 muestra curvas de concentración-respuesta del receptor GABA(A) de rata expresadas en ovocitos de *Xenopus*. Potenciación dependiente de la concentración del receptor GABA, presentada como porcentaje de respuesta evocada por GABA en CE₁₀ (2 μ M). El eje Y representa la respuesta normalizada al receptor GABA según el protocolo descrito en la parte 1.7 a continuación. El eje X representa la concentración de moxidectina (MOX), ivermectina (IVM), monosacárido de ivermectina (Monosacárido de IVM) o ivermectina aglicona (aglicona de IVM). Se ajustaron datos a la ecuación de Hill y se dan como media \pm D.T.. Véase también el ejemplo 2.4.

45 Figura 6: la figura 6 ilustra la toxicidad de ivermectina (círculo abierto) e ivermectina aglicona (círculo negro) en ratones con deficiencia de PGP. El eje X representa la dosis de ivermectina o ivermectina aglicona administrada a ratones. El eje Y representa el porcentaje de supervivencia en ratones tras una semana de administración. Véase también el ejemplo 2.5.

50 Figura 7: la figura 7 ilustra la reversión de la resistencia a fármaco por ivermectina aglicona en células CEM parentales de linfoma humano y en células CEM/VBL resistentes a vinblastina. Se incubaron células CEM/VBL 4 días con vinblastina sola de 0 a 1 μ g/ml (cuadrado negro), o con vinblastina de 0 a 1 μ g/ml e ivermectina (IVM) a 2,5 μ M (cuadrado abierto), o con vinblastina de 0 a 1 μ g/ml e ivermectina aglicona (IVM-Agli) a 2,5 μ M (círculo abierto), o con vinblastina de 0 a 1 y μ g/ml e ivermectina aglicona (IVM-Agli) a 5 μ M (círculo negro). Se incubaron células CEM 4 días con vinblastina sola de 0 a 1 μ g/ml (-*-). El eje X representa la concentración de vinblastina (VBL). El eje Y representa la citotoxicidad determinada utilizando el ensayo MTT. Los valores son medias \pm E.E.M. de 2 experimentos (3 pocillos por experimento). Véase también el ejemplo 2.6.

55 Figura 8: la figura 8 ilustra la reversión de resistencia a fármacos por ivermectina aglicona en células resistentes a múltiples fármacos DC-3F/ADX que son resistentes a actinomicina D. Se incubaron células resistentes a múltiples fármacos DC-3F/ADX 3 días con actinomicina sola de 0,01 a 10 μ M (cuadrado abierto), o con actinomicina de 0,01 a 10 μ M e ivermectina (IVM) a 5 μ M (cuadrado gris) o con actinomicina de 0,01 a 10 μ M e ivermectina aglicona (IVM-

65

Agli) a 5 μ M (triángulo negro). El eje X representa la concentración de actinomicina D. El eje Y representa la citotoxicidad determinada utilizando el ensayo MTT. Los valores son medias \pm E.E.M. de 2 experimentos (3 pocillos por experimento). Véase también el ejemplo 2.6.

5 Figura 9: la figura 9 muestra la reversión de la resistencia a ivermectina por ivermectina aglicona en *Caenorhabditis elegans* resistente a ivermectina. La resistencia a ivermectina en *C.elegans* se determina según el protocolo descrito en la parte 1.9 a continuación. El eje X representa la concentración de ivermectina. El eje Y representa el porcentaje de gravidez comparado con el control. La gravidez se evaluó en presencia de ivermectina (IVM) sola a 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20 ng/ml (círculo abierto), o ivermectina a 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20 ng/ml con verapamilo a 8 μ M (-x-), o ivermectina a 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20 ng/ml con ivermectina aglicona (IVM Agli) a 10 ng/ml (11,4 nM) (cuadrado negro). Se realizaron ensayos en 3 repeticiones por tratamiento de condición y el experimento se realizó 3 veces. Media \pm D.T.. Véase también el ejemplo 2.7.

Ejemplos

1. Materiales y métodos

1.1 Síntesis de ivermectina aglicona

20 La ivermectina aglicona (aglicona de 22,23-dihidroavermectina B1) se obtiene a partir de ivermectina por hidrólisis ácida (1% de ácido sulfúrico). La ivermectina aglicona se purifica por HPLC según el método descrito por Alvinerie *et al.* (*Ann Rech Vet*, (1987), 18, 269-274).

1.2 Análisis de estructura de ivermectina aglicona

25 HPLC

El protocolo del experimento de HPLC es el siguiente: el producto obtenido después de la reacción de síntesis se analiza por HPLC según un método modificado utilizado rutinariamente en el laboratorio del INRA. Brevemente se obtuvo un derivado fluorescente disolviendo el eluyente en disoluciones de N-metilimidazol y anhídrido trifluoroacético (Aldrich, Milwaukee, WI, EE.UU.) en acetonitrilo. Las condiciones cromatográficas incluyeron una fase móvil de ácido acético al 2%, metanol, acetonitrilo (4: 32: 64, v/v/v) bombeado a un caudal de 1,5 ml/min a través de una columna Supelcosil C18 de 3 μ m (150 x 4,6 mm) (Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU.). La detección de fluorescencia (Detector RF 551, Shimadu, Kyoto, Japón) se realizó a excitación de 365 nm y longitud de onda de emisión de 475 nm. Se realizó la validación de la técnica (Alvinerie *et al.*, 1993, *Vet Res* 24 (5): 417-21).

Espectrómetro de masas

Se realizó caracterización estructural de los productos purificados en la plataforma Axiom de INRA/ToxAlim, en un espectrómetro de masas de trampa iónica cuadrupolo LCQ (Thermo Finnigan, Les Ulis, Francia) equipado con una fuente de ionización electropulverizada haciéndose funcionar en modo positivo. El protocolo de ensayo de espectrómetro de masas es el siguiente: se introdujeron muestras recogidas en la fuente de ionización mediante infusión a un caudal de 5 l/min con una bomba de jeringa.

1.3 Cultivo celular

Las células utilizadas fueron LLC-PK1, líneas celulares epiteliales de riñón de cerdo, y LLC-PK1-mdr1a, que son células LLC-PK1 recombinantes que sobreexpresan el gen murino *abcb1a*. Todas las líneas celulares están disponibles en el laboratorio del INRA. La línea celular transfectada LLC-PK1-HcPgpA, que sobreexpresa el nematodo *Haemonchus contortus* PgpA, se desarrolló por R.Prichard (McGill University). Se cultivaron células en medio 199 suplementado con penicilina (100 unidades/ml), estreptomina (100 g/ml), 10% de suero fetal de ternera y geneticina G418 (400 mg/l) como compuesto de selección para las células LLC-PK1-mdr1a y LLC-PK1-HcPgpA. Todos los compuestos y medios son de Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia. Se sembraron células en placas de 24 pocillos (Sarstedt, Orsay, Francia) a 2×10^5 células/pocillo en medio libre de G418 hasta confluencia para actividad de transporte y en placas de 96 pocillos para ensayo de viabilidad.

Las células tumorales resistentes a múltiples fármacos utilizadas en la presente invención eran CEM parentales de linfoma humano y CEM/VLB resistentes a vinblastina (Zordan-Nudpo *et al.*, 1993) y células CEM parentales y resistentes a múltiples fármacos DC-3F/ADX seleccionadas de fibroblastos pulmonares de hámster chino DC-3F transformados espontáneamente en base a su resistencia a actinomicina D (Biedler y Riehm, 1970). Ambos tipos de células resistentes sobreexpresaron Pgp.

1.4 Modelo animal

65 Los ratones de tipo silvestre y con Pgp inactivada *mdr1ab^{-/-}* con antecedentes genéticos FVB se obtuvieron de Taconic (NY, EE.UU.). En roedores, existen dos Pgps codificadas por genes *abc1a* y *abc1b* y los ratones *mdr1ab^{-/-}* fueron

deficientes para los dos productos genéticos. Se alojó a los ratones en las instalaciones de roedores transgénicos del INRA a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. El muestreo de animales se diseñó para reducir la influencia de parámetros de interferencia como la especificidad de la camada (siete a nueve camadas diferentes para un grupo de diez animales). Los ratones recibieron una dieta estándar recomendada para la alimentación y cría de roedores (Harlan Teklad TRM Rat/Mouse Diet; Harlan Teklad, Gannat, Francia). Agua y alimentos estaban disponibles a voluntad. Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo en ratones de acuerdo con las leyes europeas sobre la protección de animales y los protocolos se realizaron bajo procedimiento y principios para una buena práctica clínica.

1.5 Moléculas sometidas a prueba

La ivermectina aglicona obtenida según el método de síntesis descrito en la parte 1.1 y purificada se utiliza en todos los experimentos comparativos de la presente invención.

La ivermectina adquirida de Sigma se utiliza como estándar de inhibición en todos los experimentos comparativos de la presente invención.

Valspodar® se proporcionó gentilmente por Novartis y se utiliza como inhibidor de referencia de Pgp.

Los tres compuestos anteriormente mencionados se solubilizan en DMSO.

1.6 Pruebas de transporte *in vitro*

Se cultivaron células con rodamina 123 (10 μM , adquiridas de Sigma) con o sin valspodar (VSP, 5 μM). Se disolvieron compuestos de interés en DMSO y se diluyeron en el medio (concentración final de DMSO = 0,1%) en un intervalo de concentración de 0,1-50 μM . Después del período de incubación de 2h, las células se lisaron y los lisados se almacenaron a -20°C hasta el análisis. Para estudiar la actividad de transporte de Pgp, se determinó la acumulación intracelular de fluorescente Rho 123 mediante la lectura de fluorescencia en los lisados celulares con un espectrofluorímetro (Perkinelmer LS50B, excitación máxima = 507 nm; emisión máxima = 529 nm). La concentración proteica se determinó en lisados con el kit BCA que utiliza albúmina de suero bovino como estándar proteico (Thermo scientific) Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia después de la normalización con respecto al contenido de proteína celular por pocillo.

1.7 Prueba de afinidad de receptor GABA

La capacidad de ivermectina o moxidectina o ivermectina aglicona o monosacárido de ivermectina para interactuar con receptores GABA se evalúa mediante mediciones electrofisiológicas. Se inyectan ovocitos de *Xenopus laevis* con 46 nl de disolución de ARN, con codificación de ARN para subunidades α_1 , β_2 y γ_2 del canal GABA a una proporción de 1010:50 nM. Los ovocitos inyectados se incuban en disolución modificada de Barth [NaCl 90 mM, KCl 3 mM, MgSO_4 0,82 mM, CaCl_2 0,41 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,34 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 100 kanamicina $\mu\text{g}/\text{ml}$, HEPES 5 mM, pH 7,6] a 18°C durante aproximadamente 36 h antes de las medidas para garantizar la expresión de un receptor funcional.

Se realizan experimentos electrofisiológicos por el método de pinza de voltaje de dos electrodos. Las mediciones se realizaron en medio ND96 que contiene NaCl 96 mM, KCl 2mM, gCl_2 1 mM, CaCl_2 1,8 mM y HEPES 5 mM, pH 7,5, con un potencial de retención de -80 mV. La corriente de control se evoca mediante la aplicación de GABA 2 μM y la potenciación relativa normalizada de corrientes evocadas GABA 2 μM mediante el aumento de la concentración de ivermectina, moxidectina, ivermectina aglicona o monosacárido de ivermectina se determina como:

$$\left[\frac{I_{\text{LM} + \text{GABA } 2 \mu\text{M}}}{I_{\text{GABA sola } 2 \mu\text{M}}} \right] / \left(\frac{I_{(\text{LM} + \text{GABA } 2 \mu\text{M})\text{Máx}}}{I_{\text{GABA sola } 2 \mu\text{M}}} \right) \times 100\%$$

en la que $I_{\text{GABA } 2 \mu\text{M}}$ es la corriente de control evocada por GABA 2 μM , $I_{\text{LM} + \text{GABA } 2 \mu\text{M}}$ es la corriente evocada por cada concentración de fármacos en aplicaciones conjuntas con GABA 2 μM , y $I_{(\text{LM} + \text{GABA } 2 \mu\text{M})\text{Máx}}$ es la corriente máxima evocada por aplicaciones conjuntas de fármacos y GABA 2 μM . Se introduce un periodo de lavado de 4 min entre cada aplicación de GABA, permitiendo que los receptores se recuperen de la desensibilización. Se utilizan tres lotes diferentes de ovocitos para recopilar datos para cada análisis. El sistema de perfusión se limpia entre dos experimentos lavando con DMSO al 10% después de la aplicación de derivados de LM para evitar contaminación.

1.8 Prueba de toxicidad *in vivo*

La toxicidad de ivermectina e ivermectina aglicona se mide en ratones deficientes de Pgp. Se inyecta a ratones $\text{Mdr1 ab}^{-/-}$ por vía subcutánea dosis crecientes de ivermectina o ivermectina aglicona formulada en propilenglicol/ formaldehído (60:40, v/v). Las dosis inyectadas más altas son 1,5 mg/kg (1,7 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) para ivermectina y 16 mg/kg (27 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) para ivermectina aglicona, respectivamente. La toxicidad se evalúa durante 24 h. Al final de la monitorización, se recoge plasma, de la vena sinusal orbital bajo anestesia de metoxiflurano y se sacrifica a los ratones para la extracción del cerebro. La sangre se centrifuga a 1500g durante 10 min, y el plasma se almacena a -20°C hasta el análisis. Los

cerebros se extraen, se lavan en solución salina y se congelan a -20°C hasta el análisis.

1.9 Ensayo de resistencia a ivermectina en *Caenorhabditis elegans*

5 Para determinar la resistencia con respecto a ivermectina (IVM) en *C.elegans*, se utilizó un método de ensayo de grávidos, basándose en el desarrollo de huevos a adultos grávidos durante un período de incubación de 96 horas. Los huevos se recogieron a través del enjuague de gusanos *C.elegans* resistentes a IVM (IVR10). Se incubaron sesenta huevos/pocillo, en condiciones estándar durante cuatro días (96 horas) para llegar a la edad adulta (grávido) en presencia de fármacos como se indica a continuación: ivermectina aglicona (IVM-Agli) sola a 10 ng/ml (11,4 nM);
10 verapamilo (VRP) solo a 8 μM ; IVM sola: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20 nM; IVM + VRP 8 μM : 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20 ng/ml IVM; IVM + IVM-Agli 10 ng/ml: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20 ng/ml (0,114-22,8 nM) IVM. Se realizaron ensayos en triplicados por condición de tratamiento y el experimento se realizó 3 veces.

2. Resultados

15 2.1 Síntesis de ivermectina aglicona

Se obtiene ivermectina aglicona a partir de ivermectina por hidrólisis ácida, que corta el enlace químico entre el macrociclo y el grupo disacárido. El producto obtenido después de esta reacción es una mezcla de aproximadamente
20 80% de ivermectina aglicona y 20% de monosacárido de ivermectina, tal como se muestra mediante el perfil estructural realizado por HPLC (figuras 1A y 1B). La ivermectina aglicona obtenida por dicho método de síntesis se caracteriza por un grupo hidroxilo sobre carbono C13 de macrociclo (figura 1B) y un tiempo de retención de 3 minutos en nuestras condiciones cromatográficas, más corto que el de ivermectina (5 minutos) o el de derivado de monosacárido (4 minutos).

25 A continuación, el producto obtenido se analizó entonces mediante espectrometría de masas, que confirma la presencia de un pico de masa en 609,3 que corresponde a la ivermectina aglicona ionizada (figura 2), mientras que el pico de masa de ivermectina aglicona nativa es de 586,8.

30 2.2 Potencia inhibitoria de ivermectina aglicona para Pgp en modelo celular

La potencia inhibitoria de ivermectina aglicona para actividad de transporte de Pgp se evalúa en células transfectadas LLCPK1-mdr1a sobreexpresando Pgp murina (*mdr1a*). La inhibición máxima se ha obtenido con Valspodar®, el inhibidor de referencia más potente de Pgp conocido en el pasado. Se confirma que la ivermectina es un inhibidor de
35 Pgp tan potente como valspodar® (figuras 3). También se muestra que la ivermectina aglicona tiene una eficacia comparable para inhibir la Pgp murina con la de la ivermectina, con efecto máximo ($E_{\text{máx}}$) a unos 10 μM (tabla 1, figuras 3).

40 **Tabla 1:** Efecto inhibitorio de ivermectina e ivermectina aglicona en células que sobreexpresan Pgp murina.

	Ivermectina	Ivermectina aglicona
CE_{50} (μM)	0,5	1,0
$C_{\text{máx}}$ (μM)	5,0	10,0
$E_{\text{máx}}$ (% de valspodar®)	88,0	80,0

CE_{50} : concentración efectiva para inhibir el 50% del transporte de rodamina 123 por Pgp murina.

45 $C_{\text{máx}}$: concentración para obtener el máximo efecto inhibitorio.

$E_{\text{máx}}$: efecto máximo comparado con efecto máximo obtenido con 5 μM de valspodar.

50 2.3 Diferente potencia inhibitoria de ivermectina aglicona para Pgp murina y Pgp de nematodos

La potencia inhibitoria de ivermectina aglicona o ivermectina para Pgp murina o Pgp de nematodos se mide, respectivamente, en células LLCPK1-mdr1a, que sobreexpresan Pgp murina (MDR1), o en el modelo celular desarrollado por R. Prichard, que sobreexpresa Pgp de nematodos *Haemonchus contortus*: hc-pgpA. Los resultados muestran que la ivermectina tiene potencia similar a inhibir Pgp de mamíferos ($CE_{50} = 0,5 \mu\text{M}$) y HcPgpA de nematodos
55 ($CE_{50} = 0,6 \mu\text{M}$) (tabla 2, figuras 4A y 4B), mientras que la ivermectina aglicona tiene 5 veces mayor potencia inhibitoria para el parásito HcPgpA ($CE_{50} = 0,5 \mu\text{M}$) que para la Pgp de mamíferos ($CE_{50} = 2,5 \mu\text{M}$). Estos resultados indicaron claramente que la ivermectina aglicona es más potente en la inhibición de HcPgpA de nematodos que la Pgp de mamíferos.

60 **Tabla 2:** Concentración de la mitad de efecto inhibitorio de ivermectina e ivermectina aglicona en células que sobreexpresan Pgp

	CE50 μM	
	Ivermectina	Ivermectina aglicona
Pgp murina	0,5	2,5
PgpA de nematodos	0,6	0,5

2.4 Capacidad de ivermectina aglicona o monosacárido de ivermectina para abrir el receptor GABA en presencia de GABA.

De la capacidad de ivermectina aglicona o monosacárido de ivermectina para potenciar la acción de GABA sobre el receptor GABA, se evaluó según el protocolo descrito anteriormente mencionado en la parte 1.7, y se comparó con ivermectina.

Los resultados mostrados en la tabla 4 muestran que el monosacárido de ivermectina (Monosacárido de IVM) y la ivermectina aglicona (IVM-Agli) es un agonista débil ($CE_{50} = 122,4$ nM para Monosacárido de IVM y $CE_{50} = 215,1$ nM para IVM-Agli) en comparación con la ivermectina ($CE_{50} = 29$ nM) (tabla 3, figura 5). Este resultado significa que el monosacárido de ivermectina y la ivermectina aglicona tienen una neurotoxicidad mucho más débil en comparación con la ivermectina, y es posible un uso farmacéutico de ivermectina aglicona o monosacárido de ivermectina.

Tabla 3: Parámetros de interacción de IVM y derivados con receptores GABA: CE_{50} es la concentración necesaria para inducir la mitad de la potenciación máxima del efecto de GABA por LM o derivados.

LM	CE_{50} (nM)
MOX	$5,6 \pm 1,5$
IVM	$29,3 \pm 3,4$
Monosacárido de IVM	$122,4 \pm 20,3$
IVM Aglicona	$215,1 \pm 12,45$

2.5 Toxicidad *in vivo* de ivermectina aglicona

La prueba de toxicidad *in vivo* en ratones deficientes de Pgp confirma que la dosis letal para ivermectina es de 0,6 a 0,8 mol/kg, como se describe por Schinket *et al.* (Cell (1994) 77, 491-502). Por el contrario, la ivermectina aglicona no muestra ninguna toxicidad cuando se administra con una dosis hasta 10 veces superior a la de ivermectina (figura 6). Este resultado confirma que la ivermectina aglicona tiene una toxicidad *in vivo* mucho más débil en comparación con la ivermectina y es posible un uso farmacéutico de ivermectina aglicona.

2.6 Reversión de resistencia a múltiples fármacos por ivermectina aglicona en células tumorales resistentes a múltiples fármacos

Las células CEM/VLB y las células DC-3F/ADX descritas en la parte 1.3 mencionada anteriormente se cultivaron en placas de 96 pocillos y se permitió que crecieran durante 24 h. Posteriormente se incubaron 4 días con vinblastina (intervalo de concentración 0-1 μM) con o sin IVM a 2,5 μM o con ivermectina aglicona (IVM-Agli) a 2,5 y 5 μM (figura 7); o 2 días con actinomicina D con actinomicina (intervalo de concentración 0,01-10 μM) con o sin ivermectina (IVM) o ivermectina aglicona (IVM-Agli) a 5 μM (figura 8). La citotoxicidad se determinó utilizando el ensayo MTT. Los valores de IC_{50} se determinaron gráficamente y representan la concentración necesaria para la supervivencia de célula media. La reversión de cambio de la resistencia a múltiples fármacos llamados factores de reversión fueron la proporción de IC_{50} para fármacos tóxicos solos/ IC_{50} para fármacos tóxicos en presencia de IVM-Agli.

La IVM-Agli fue capaz de revertir la resistencia de fármacos en células tumorales sobreexpresando Pgp. CEM/VBL son altamente resistentes a VBL y las células fueron totalmente viables en 1 μM de vinblastina, mientras que las células parentales son altamente sensibles a VBL a concentraciones inferiores a 0,001 μM . La incubación de manera conjunta de VBL con IVM a 2,5 μM , o IVM-Agli a 5 μM provocan un claro desplazamiento a la izquierda de la curva celular de viabilidad (figura 7) demostrando que las células están sensibilizadas a VBL en presencia de los compuestos sometidos a prueba. En presencia de IVM a 2,5 μM el VBL IC_{50} fue 0,2 μM y en presencia de IVM-Agli a 2,5 y 5 μM , los valores IC_{50} fueron 1 y 0,2 μM , reflejando que IVM-Agli tiene una potencia inhibitoria similar a la de IVM (tabla 1). Además, la viabilidad de DC-3F/ADX no se alteró por 1 μM de actinomicina D, mientras que cuando se combina con IVM o IVM-Agli a 5 μM de actinomicina D se volvió tóxica (figura 8).

Los resultados de la figura 7, la figura 8 y la tabla 4 mostraron que la capacidad de ivermectina aglicona para revertir la resistencia a vinblastina o actinomicina D en células tumorales que sobreexpresan Pgp era del mismo orden de potencia que la ivermectina, que es un potente inhibidor de los transportadores de MDR.

Tabla 4: Comparación de IC_{50} y factor de resistencia (FR) para IVM y IVM Agli en células resistentes a múltiples

fármacos

		IC ₅₀ (μM)	FR
CEM/VBL			
	VBL	Nd	
	VBL + IVM 2,5 μM	0,2	
	VBL + IVM-Agli 2,5 μM	1,0	
	VBL + IVM-Agli 5 μM	0,2	
DC-3F/ADX			
	ActD	5,0	
	ActD + IVM 5 μM	0,11	45
	ActD + IVM-Agli 5 μM	0,08	62

5 Nd: no determinado

2.7 Reversión de resistencia antihelmíntica por ivermectina aglicona en *C.elegans* resistentes a ivermectina

10 Se estudió la acción de reversión de ivermectina aglicona (IVM-Agli) sobre los nematodos *Caenorhabditis elegans* resistente a ivermectina (IVR10). Esta cepa se ha seleccionado previamente bajo presión de IVM y se ha mostrado que sobreexpresaba genes homólogos P-gp (James y Davey, 2009). Se midió la capacidad de IVM-Agli para restaurar el desarrollo de huevos a adultos que se ha retrasado por el efecto de ivermectina sobre la cepa IVR10, y se comparó su efecto con el efecto de reversión de verapamilo (VRP).

15 La resistencia con respecto a ivermectina en *C.elegans* se mide según el protocolo descrito en la parte 1.9 mencionada anteriormente.

20 IVM bloqueó el desarrollo de huevos *C.elegans* IVR10 a una concentración media de 10 nM confirmando que esta cepa es resistente a IVM. La IC₅₀ para IVM fue 6,8 ± 0,2 ng/ml (7,8 ± 0,2 nM). Verapamilo, un conocido agente de reversión de Pgp, a 8 μM no tuvo ningún efecto en el desarrollo de los *C.elegans* solos, y fue capaz de restaurar el desarrollo de gusanos detenidos en presencia de IVM. La curva de eficacia de IVM fue por tanto desplazada hacia la izquierda con la IC₅₀ de IVM reducida a 3,2 ± 0,5 ng/ml (3,6 ± 0,6 nM) en comparación con IVM sola (figura 9, tabla 5). IVM-Agli a 10 ng/ml también fue capaz de disminuir significativamente la CE₅₀ de IVM a 4,5 ± 0,3 ng/ml (5,1 nM, tabla 5), y IVM-Agli solo a 10 ng/ml no tuvo efectos sobre el desarrollo de los *C.elegans* sugiriendo que IVM-Agli también revierte una resistencia mediada por Pgp a fármacos.

30 La menor CE₅₀ para la eficacia de ivermectina en *C. elegans* resistentes a IVM determinados en presencia de IVM-Agli da testimonio de que IVM-Agli es capaz de revertir parcialmente la resistencia a IVM. Basándose en el hecho de que el verapamilo son inhibidores bien conocidos de Pgp, sus efectos comparables a los producidos por IVM-Agli sugieren que la reversión de IVM-Agli también ocurre a través de la inhibición de transportadores similares a Pgp.

Tabla 5: Comparación de IC₅₀ y el factor de resistencia (FR) para el agente de reversión de referencia, valsopodar y verapamilo y IVM-Agli en *C. elegans* resistentes a ivermectina.

	IC ₅₀ (nM)	FR
IVM sola	7,8 ± 0,2	
IVM + verapamilo (4μM)	3,6 ± 0,6	2,1
IVM+ IVM-Agli (11,4 nM)	5,1 ± 0,3	1,5

35

REIVINDICACIONES

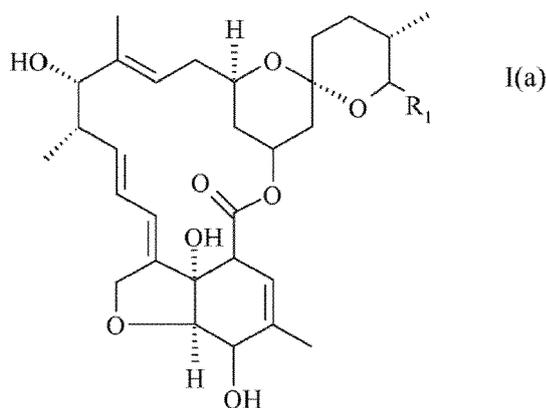
1. Composición que comprende:

5 - un compuesto de fórmula I, y

- un ingrediente activo elegido de un antiparasitario, un agente antitumoral, un agente antiviral, un agente antiepiléptico, un agente antibacteriano, en particular un antibiótico o un antifúngico,

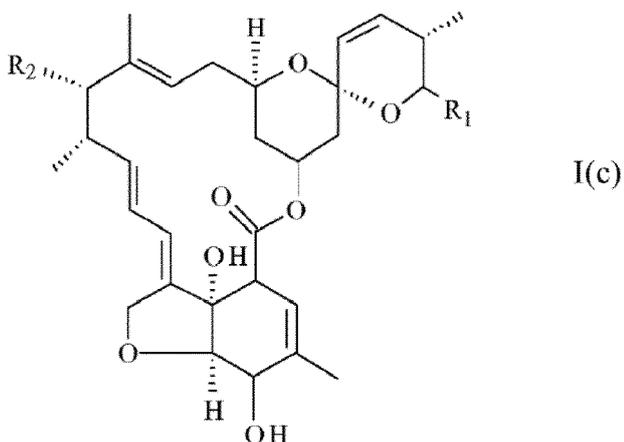
10 para su uso como medicamento en el tratamiento de infecciones parasitarias, infecciones virales, cánceres resistentes a quimioterapia, o epilepsia, infecciones bacterianas o infecciones fúngicas;

en la que el compuesto de fórmula I es un derivado de avermectina de fórmula I(a):

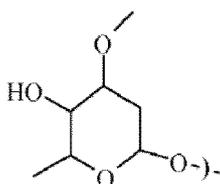


15 en la que R1 se elige del grupo constituido por $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ y $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$; o

20 en la que el compuesto de fórmula I es un derivado de avermectina de fórmula I(c):



en la que R1 se elige del grupo constituido por $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ y $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$; y R2 es $-\text{OH}$ o



25 y en la que el compuesto de fórmula I(a) inhibe la proteína transportadora de casete de unión a ATP unido a la membrana (ABC) para mejorar la concentración intracelular del ingrediente activo para restablecer o

mejorar la eficiencia del ingrediente activo.

- 5
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque el agente antiparasitario se elige del grupo que comprende lactona macrocíclica, como las avermectinas, en particular ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina o selamectina, o las milbemicinas, en particular moxidectina, nemadectina, o milbemicina oxima.
- 10
3. Composición para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque el agente antiparasitario se elige de un antiplasmodium, como quinina o cloroquina, o una antileishmania, como sitamaquina.
- 15
4. Composición para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque el agente antitumoral se elige del grupo que comprende
- antibiótico antitumoral de tipo antraciclina, como daunorrubicina, doxorrubicina, mitomicina C, mitoxantrona, adriamicina y actinomicina, o
 - taxanos, como docetaxel, paclitaxel, o
 - alcaloides, como vinblastina, vincristina, o
 - epipodofilotoxinas, como etopósido, irinotecán, tenipósido y topotecán.
- 20
5. Composición para su uso según la reivindicación 1, caracterizada porque el agente antiviral es un inhibidor de proteasas antirretrovirales, como ritonavir o saquinavir.
- 25
6. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición es una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de infecciones parasitarias, infecciones virales, cánceres resistentes a quimioterapia o epilepsia, infecciones bacterianas o infecciones fúngicas.
- 30

Figura 1A

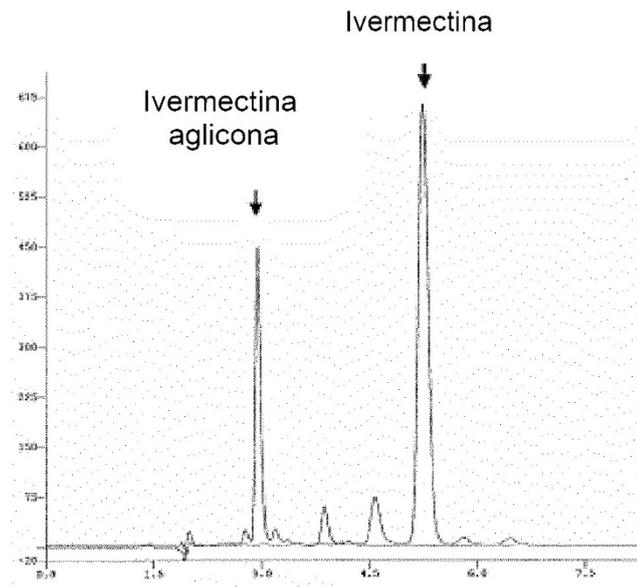


Figura 1B

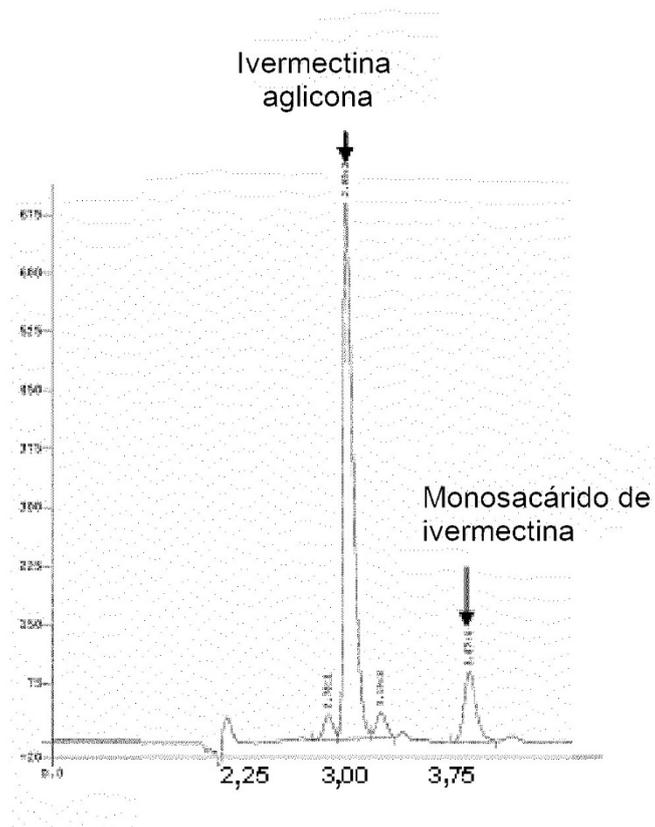


Figura2

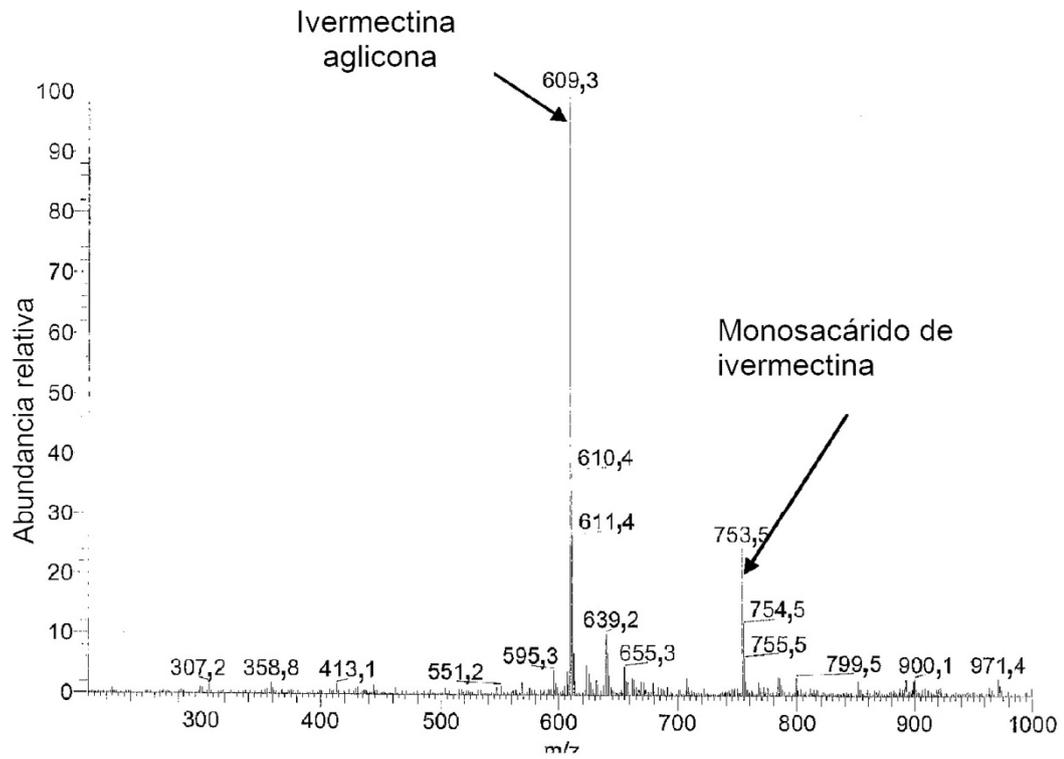


Figura3

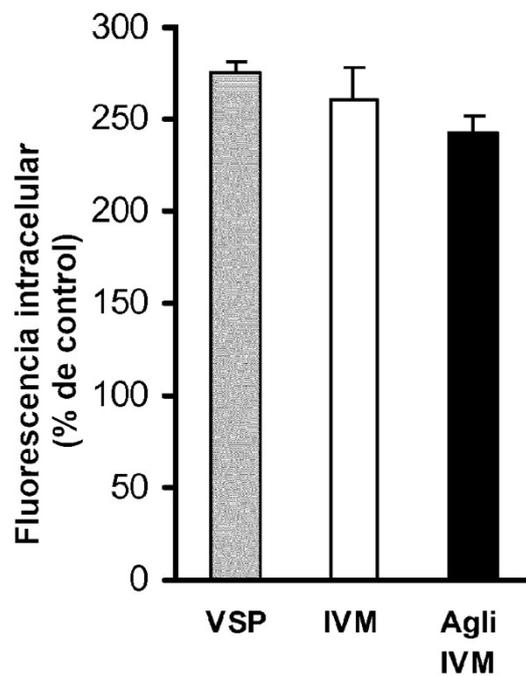


Figura 4A

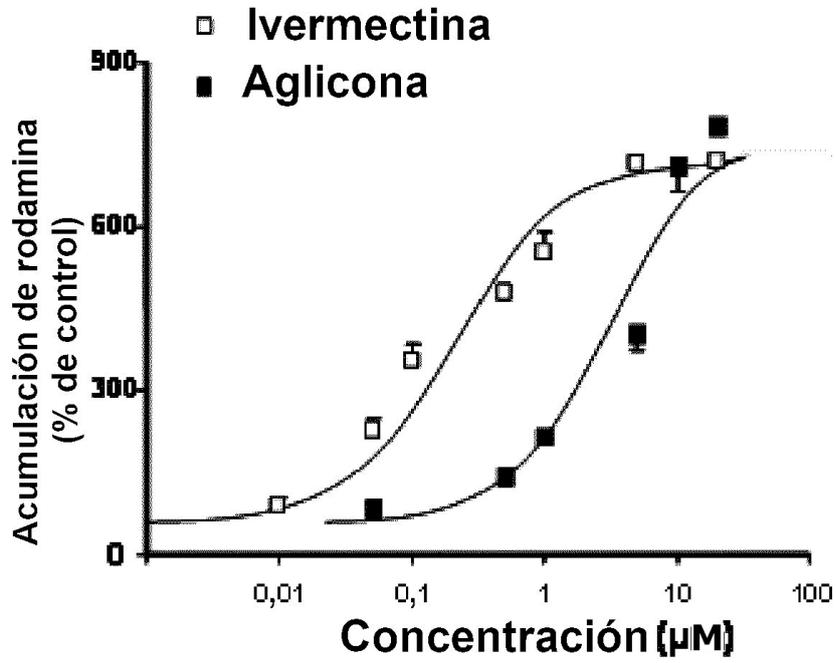


Figura 4B

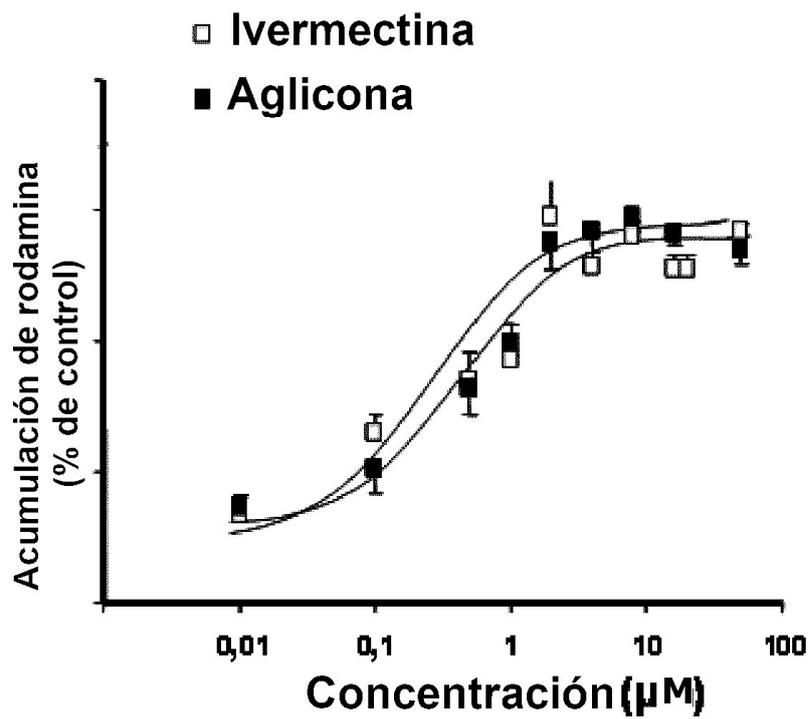


Figura 5

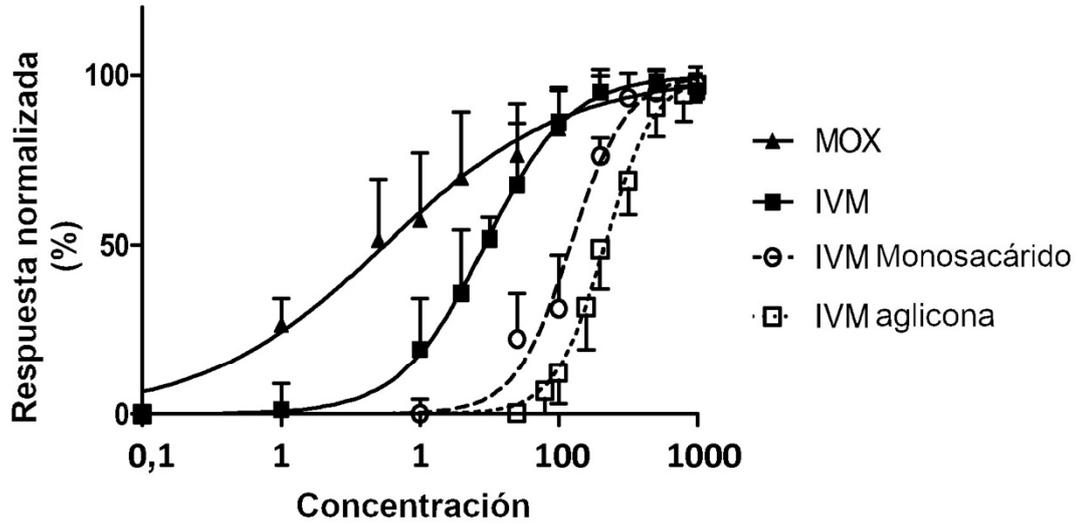


Figura 6

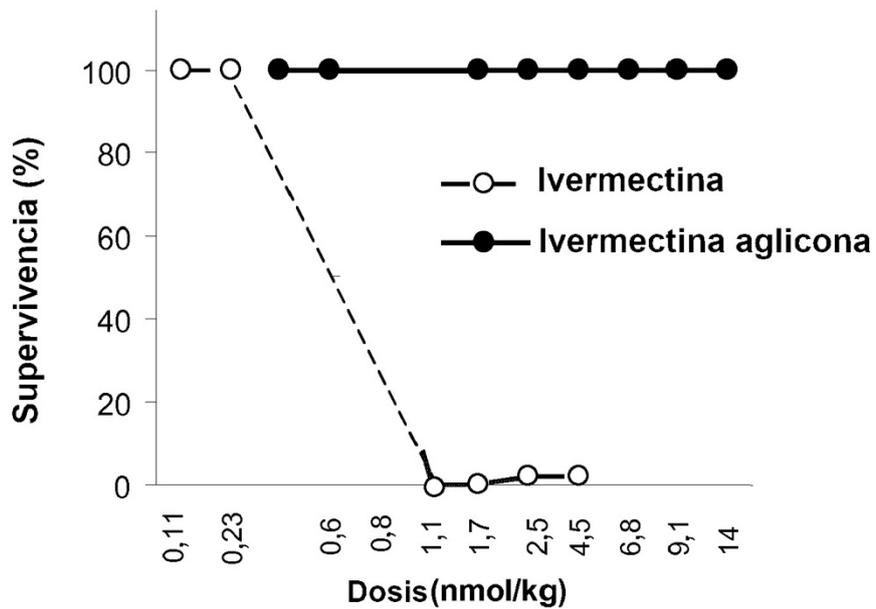


Figura 7

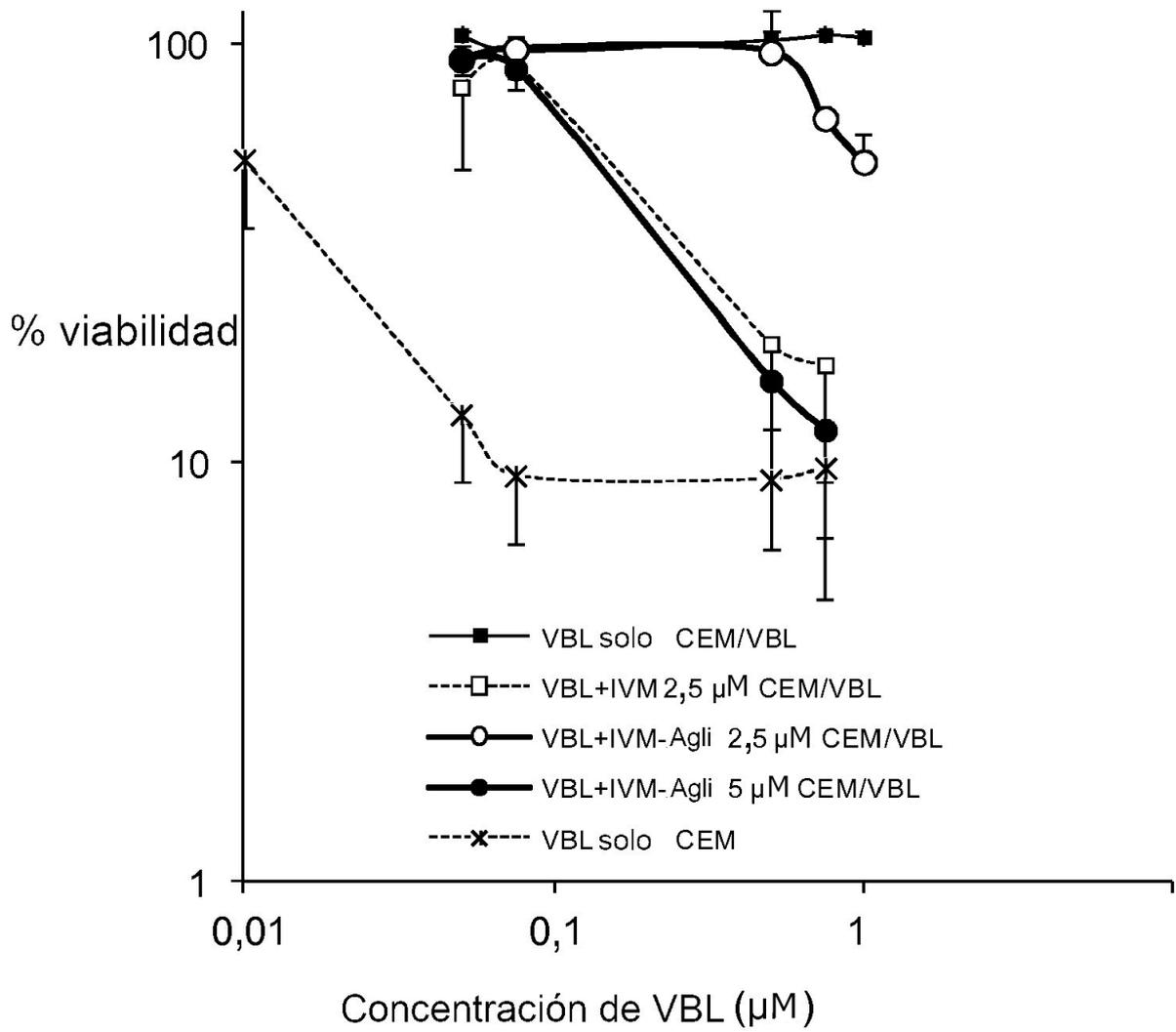


Figura 8

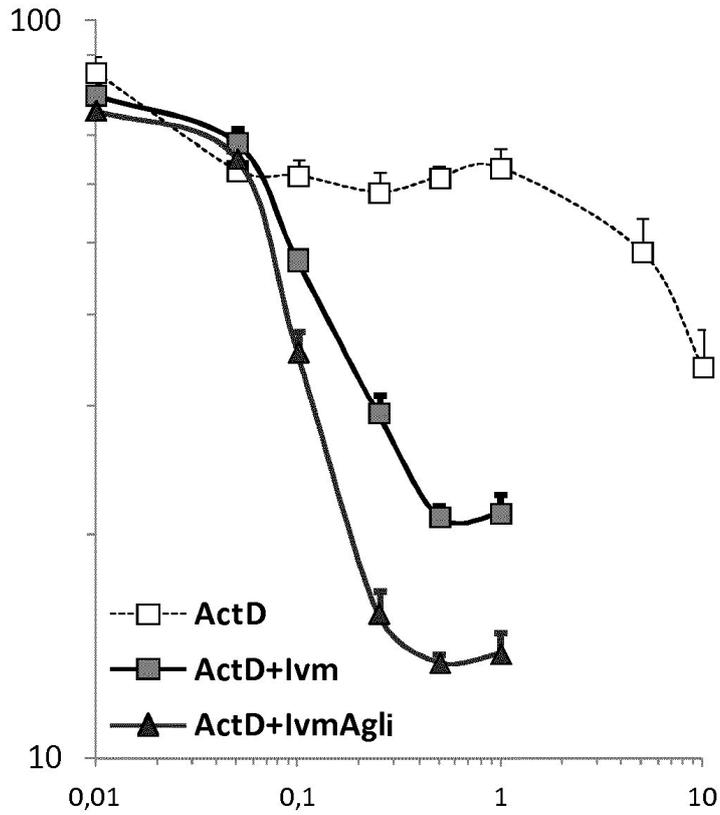


Figura 9

