

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 957 539**

21 Número de solicitud: 202230496

51 Int. Cl.:

A61K 36/02 (2006.01)

A61K 31/025 (2006.01)

A61K 31/045 (2006.01)

A61P 33/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

06.06.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.01.2024

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

13.01.2025

Fecha de concesión:

05.02.2025

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.02.2025

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (95.00%)

Calle Pedro Zerolo s/n

38200 La Laguna (Santa Cruz de Tenerife) ES y

UNIVERSIDAD FEDERAL DE RIO DE JANEIRO

(5.00%)

72 Inventor/es:

PEIXOTO NOCCHI CARNEIRO, Nathalia;

FERNÁNDEZ CASTRO, José Javier;

DÍAZ MARRERO, Ana Raquel;

LORENZO MORALES, Jacob;

PIÑERO BARROSO, José;

ARBERAS JIMÉNEZ, Íñigo;

SIFAOU, Inés;

RIZO LIENDO, Aitor y

RIBEIRO SOARES, Angelica

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Nuria

54 Título: **USO DEL COMPUESTO (+)-ELATOL PARA EL TRATAMIENTO O PREVENCIÓN DE UNA INFECCIÓN DE NAEGLERIA FOWLERI**

57 Resumen:

La presente invención describe el uso de un compuesto sesquiterpeno para el tratamiento o prevención de meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) causada por *Naegleria fowleri* en un sujeto humano o animal, preferiblemente del compuesto (+)-elatol, y la composición farmacéutica que contiene dicho compuesto.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 957 539 B2

DESCRIPCIÓN

USO DEL COMPUESTO (+)-ELATOL PARA EL TRATAMIENTO O PREVENCIÓN DE UNA INFECCIÓN DE NAEGLERIA FOWLERI

5

SECTOR TÉCNICO

La presente invención pertenece al campo de la medicina y microbiología. Refiere a principios activos contra la ameba *Naegleria fowleri* y al tratamiento y/o profilaxis de la infección y la enfermedad Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) que provoca.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Naegleria es un género protista de ameba de vida libre que pertenece a la familia Vahlkampfiidae y clase Heterolobosea. Se encuentra comúnmente en agua dulce templada entre 25 y 46°C de lagos, ríos, aguas termales, fuentes de agua industriales o suministros de agua domésticos, y en el suelo de todo el mundo.

15

La solicitud RU2649091 describe un método para combatir la proliferación de *Naegleria fowleri* en un medio por la aplicación de otro agente biológico, *Willaertia magna*.

20

Naegleria fowleri, también conocida como “ameba come cerebro”, es la única especie 20 del género que es patógena para los humanos. El microbio accede al cerebro y causa una enfermedad del sistema nervioso central denominada Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP). Es una infección aguda de muy difícil detección que produce edema cerebral, hemorragia, necrosis y una respuesta inflamatoria masiva y fulminante del tejido cerebral, que finalmente resulta en coma y muerte rápida del paciente.

25

La gestión de la MAP debida a *N. fowleri* es el principal desafío para todos los países con prevalencia de la enfermedad. Sin embargo, actualmente no existe un tratamiento eficaz adecuado que brinde seguridad para la supervivencia del paciente.

30

La mayor parte de la información sobre la eficacia terapéutica de fármacos contra *N. fowleri* se basa en informes de casos o estudios *in vitro*, con éxitos terapéuticos variables. La efectividad de los tratamientos no está clara, ya que casi todas las infecciones han sido fatales y los resultados de éxito son controvertidos. El tratamiento de la enfermedad está muy condicionado por el tiempo de actuación, es extremadamente limitado y no está bien definido - actualmente sólo es

35

posible por una estrategia denominada "reutilización" de fármacos con un cóctel terapéutico combinado que incluye antifúngicos, antibióticos y microbicidas conocidos.

El fármaco antifúngico anfotericina B ha sido la base del tratamiento de la MAP (Gharpure R. y cols. "Epidemiology and Clinical Characteristics of Primary Amebic meningoencephalitis Caused by *naegleria fowleri*: A Global Review"; Clinical Infectious Diseases, 2021, Vol. 73, Issue 1). Se utiliza en todos los pacientes infectados sin tener en realidad una eficacia universal, ya que solo 8% se recuperan al menos de forma parcial después de su administración solo o en combinación con otros medicamentos, lo que hace difícil determinar su eficacia. El gran inconveniente de la anfotericina B es su elevada toxicidad, lo cual condiciona mucho su administración y la evolución del paciente.

La solicitud GB2592782 A describe la miltefosina para tratar infecciones amebianas en estado libre, entre ellas *N. fowleri*. Los autores confirman la supervivencia de tres pacientes en el mundo tras el tratamiento con miltefosina. De hecho, presenta resultados prometedores y exitosos en terapia combinada aunque las tasas de mortalidad siguen siendo muy altas incluso con los mejores regímenes disponibles.

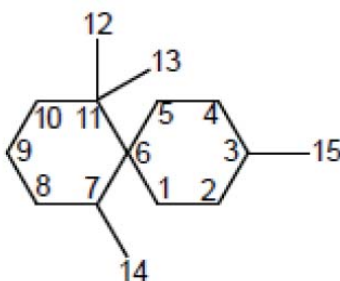
WO2022/008761 describe unos compuestos heterocíclicos sintéticos que presentan cierta actividad contra *Naegleria fowleri*, y la patente US10377733B1 encuentra actividad en compuestos con estructura de sesquiterpenos, en particular.

El uso y estudio de sustancias naturales, sobre todo de plantas y microorganismos, ha sido muy relevante para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos protozoarios. Recientemente, algunos trabajos han evaluado el potencial de compuestos extraídos de algas frente a ameba. En particular los sesquiterpenos del tipo laurano y ciclolaurano aislados de *Laurencia johnstonii* han demostrado buena actividad para *Naegleria fowleri* (Arberas-Jiménez I. y cols. "Laurinterol from *Laurencia joshstonii* eliminates *Naegleria fowleri* triggering PCD by inhibition of ATPases"; Scientific Reports, 10, 17731, 2020). Sin embargo, sus Índices de Selectividad (IS) no satisfacen los criterios establecidos para ser considerados antiparasitarios aptos para su administración.

Por desgracia, los tratamientos médicos administrados actualmente contra el MAP presentan poca eficacia terapéutica y múltiples efectos secundarios graves, muchas veces irreversibles en los pacientes que sobreviven. El gran inconveniente de todos los tratamientos utilizados hoy día

para tratar una infección de *Naegleria fowleri* es su alta toxicidad y baja efectividad, razón por la que su uso clínico es muy limitado.

Los sesquiterpenos de origen marino son una familia de compuestos de una amplia variabilidad que pueden ser aislados de algas del género *Laurencia* e invertebrados. Constituyen actualmente más de 575 estructuras (Cikoš, A. M. y cols. "Update on sesquiterpenes from red macroalgae of the *Laurencia* genus and their biological activities (2015–2020)"; Algal Research, 56, 102330, 2021). Entre ellos, los de tipo chamigreno son muy representativos y suponen aproximadamente un 30% de todos los sesquiterpenos aislados. Se caracterizan por presentar un esqueleto spiro [5.5]undecano en que un carbono cuaternario estereogénico (C-6) une los spirociclos, con mucha variabilidad de sustitución con grupos funcionales.

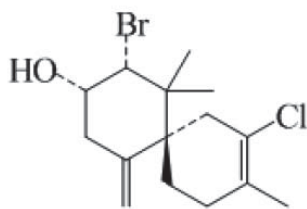


Los α -chamigrenos, β -chamigrenos y nor-chamigrenos no son funcionalmente equivalentes entre ellos, aparte que se han descrito además otros tipos de funcionalización (Harizani, M. y cols. "The *Laurencia* paradox: An endless source of chemodiversity"; Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 102, 91-252, 2016).

La familia de chamigrenos muestra un amplio espectro biológico, con actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, citotóxica y antiparasitaria. Actividad antiparasitaria específica presentarían los β -chamigrenos, nor-chamigrenos y chamigrenos con capacidad de oxigenación en C-7, chamigrenos que presentan un anillo 5,10-epóxido o un carbociclo con la migración previa de un metilo de C-11 a C-10.

De muchos de estos compuestos ya se ha logrado con éxito su síntesis parcial o total. Igualmente, los esqueletos chamigrenos naturales sirven de modelo en la síntesis de muchos otros compuestos sintéticos.

Entre otros, el chamigreno (+)-elatol presenta diversas propiedades farmacológicas, mostrando actividad acaricida y repelente, larvicida, antimicrobiana contra bacterias y hongos patógenos humanos, antiproliferativa, antileishmania, antitripanocida y antiviral.



- 5 El problema de la técnica es encontrar nuevos principios activos para desarrollar fármacos eficaces en el tratamiento de la MAP provocada por *Naegleria fowleri*. La presente invención propone los compuestos sesquiterpenos de tipo chamigreno como principios activos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 10 La presente invención es el uso de un compuesto sesquiterpeno chamigreno para el tratamiento o la prevención de una infección por *Naegleria fowleri* en un sujeto, preferiblemente meningoencefalitis amebiana primaria (MAP).

- En un aspecto preferible, dicho sesquiterpeno chamigreno está seleccionado de entre (+)-elatol,
15 (-)-elatol y (-)-rogiolol, más preferiblemente aún (+)-elatol.

- En otro aspecto preferible, dicho compuesto chamigreno está seleccionado del grupo compuesto por β -chamigrenos, nor-chamigrenos, chamigrenos con capacidad de oxigenación en C-7, o chamigrenos que presentan un anillo 5,10-epóxido o un carbociclo con la migración previa
20 de un metilo de C-11 a C-10.

- Se han reportado infecciones por *N. fowleri* tanto en humanos como en animales como carnívoros, caballos, rumiantes y algunos animales salvajes. De modo que un aspecto de la invención es que el sujeto infectado sea un animal y un aspecto más preferible es que dicho
25 sujeto sea humano.

- Los compuestos chamigrenos muestran unos valores de citotoxicidad IC_{50} frente a *N. fowleri* muy bajos y, en concreto, el (+)-elatol equivalente al de la anfotericina B; por tanto, resulta una alternativa posible en el tratamiento de una infección por el microbio. A pesar de que la
30 anfotericina B muestra valores bajos de IC_{50} frente a las células de mamíferos, lo cual ha recomendado su uso, en realidad no resulta una referencia válida por la elevada toxicidad (CC_{50})

que presenta in vivo. Es por esta razón por la que la presente invención propone los compuestos chamigrenos como principios activos eficaces que pueden servir de base para desarrollar fármacos con valor terapéutico contra la infección en un paciente.

- 5 De modo que otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto sesquiterpeno chamigreno junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente otro ingrediente activo, preferiblemente un antifúngico. En otro aspecto preferible más, dicha composición es para administración intravenosa o nasal.
- 10 Otro aspecto de la invención es un método que comprende la administración de al menos una composición adicional que incluye al menos otro agente o fármaco, más preferiblemente un antifúngico, más preferiblemente aún caspofungina, natarnicina, miconazol, voriconazol, fluconazol, o sus derivados o una combinación de ellos.
- 15 Un aspecto de la invención es un método de tratamiento de una infección causada por *N. fowleri* que comprende administrar un sesquiterpeno chamigreno a un paciente en necesidad de ello. Otro aspecto comprende combinar dicho sesquiterpeno chamigreno con una segunda formulación que comprende un segundo agente activo con actividad fungicida en combinación.
- 20 Otro aspecto preferible es un kit que comprende una formulación de un compuesto sesquiterpeno chamigreno, y opcionalmente un segundo compuesto donde dicho compuesto es un fungicida, e instrucciones de preparación del agente activo y de uso frente a una infección por *N. fowleri*.

25 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Aislamiento de los compuestos chamigreno

Se llevó a cabo el aislamiento de compuestos chamigrenos a partir de muestras 30 liofilizadas de la macroalga roja *Laurencia dendroidea*.

- 30 A partir de las muestras liofilizadas se obtuvieron diferentes extractos en metanol:acetato de etilo (1:1), cloroformo:metanol (1:1) y diclorometano, por maceración a temperatura ambiente asistida por ultrasonido durante 15 min, seguido de filtración y concentración a vacío usando un rotavapor a 40°C. Los extractos resultantes fueron cromatografiados en una columna de exclusión molecular Sephadex® LH-20 utilizando una mezcla de hexano:diclorometano:metanol
- 35 (2:1:1) como eluyente o en columna flash de sílice eluidas con mezclas de polaridad creciente de

n-hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol, obteniéndose entre siete a doce fracciones dependiendo del extracto. A partir del análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ^1H las fracciones enriquecidas con sesquiterpenos se procesaron posteriormente por cromatografía en columna abierta de sílica gel, Lobar LiChroprep Si-60 de media presión (40–63 μm , MERCK®) y/o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una columna semi-preparativa de sílice utilizando mezclas de n-hexano:acetato de etilo de polaridad creciente adecuadas a la naturaleza de la muestra. Se aislaron un total de 12 chamigrenos conocidos: (+)-elatol; (-)-elatol; (+)-debromoelatol; (-)-10-bromochamigra-3,7(14)-dien-9-ol; (+)-obtusol; (-)-dendroidiol; (+)-obtusano; (-)-3,10-dibromo-4-cloro-alfa-chamigreno; (-)-cartilagineol; (-)-rogiolol; (+)-isoobtusol y nifediceno.

Las estructuras químicas de los compuestos aislados se establecieron por RMN de ^1H y ^{13}C , espectroscopía de correlación (COSY), correlación de enlace múltiple heteronuclear (HMBC) y correlación cuántica simple heteronuclear (HSQC) en un sistema Bruker® Avance de 600 MHz utilizando CDCl_3 . Los desplazamientos químicos se informaron en ppm con referencia a las señales del solvente (CDCl_3 : δH 7,26, δC 77,16). Los datos de espectrometría de masas se adquirieron usando un sistema VG-Autospec Fisons en modo de ionización por electropulverización. Las rotaciones específicas $[\alpha]_D$ se determinaron utilizando un Polarímetro Perkin-Elmer® (modelo 241), en condiciones de 20°C, línea D de sodio $\lambda = 589\text{ nm}$ y longitud de paso celular 1 dm. Los compuestos se identificaron comparando sus datos espectroscópicos con la literatura disponible.

Ejemplo 2. Cultivos celulares

Se utilizaron dos cepas de *Naegleria fowleri* obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC® 30808™ y ATCC® 30215™) (LG Promochem, Barcelona, España). Ambas cepas fueron cultivadas en Bactocasitona al 2% (p/v) (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) suplementada con un 10% (v/v) de suero bovino fetal, 0,3 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina G sal sódica y 0,5 mg/ml de sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a 37°C.

Para los ensayos de citotoxicidad se utilizó una línea celular de macrófagos murinos J774A.1 (ATCC # TIB-67, LG Promochem, Barcelona, España). Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium) suplementado con un 10% de suero bovino fetal y 10 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina (Sigma-Aldrich, Madrid, España). El cultivo se mantuvo a 37°C en una atmósfera del 5% de CO_2 .

Ejemplo 3. Actividad in vitro contra *Naegleria fowleri* y citotoxicidad

Todos los compuestos testados fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO). La actividad in vitro de los compuestos seleccionados se evaluó por un ensayo colorimétrico basado en el reactivo alamarBlue®. Las amebas fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una concentración de 2×10^5 células/mL (50 µL). A continuación, se prepararon diluciones seriadas (en el mismo medio en el que se encuentran las amebas) del compuesto y se añadieron (50 µL) a los pocillos donde se encuentran las células de *Naegleria fowleri*. Por último, se añadió un 10% del volumen total de alamarBlue® a los pocillos y se dejó incubar en agitación suave a 37°C durante 48 horas. Pasado ese tiempo, se realizó la lectura de la fluorescencia emitida en un lector de placas Enspire® Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, España) utilizando una longitud de onda de emisión de 570 nm y una longitud de onda de excitación de 585 nm (Rizo-Liendo A. y cols. “*In Vitro Activity of Statins against Naegleria fowleri*.”; Pathog., vol. 8, no. 3, p. 122, 2019, doi: 10.3390/pathogens8030122).

Para evaluar la citotoxicidad se llevó a cabo un ensayo basado en el reactivo alamarBlue®. Brevemente, los macrófagos murinos (2×10^5 células/ml) se incubaron con diluciones seriadas del compuesto a evaluar realizadas en el mismo medio de cultivo. Por último, se añadió el alamarBlue® a cada pocillo y se mantuvo a 37°C y un 5% de CO₂ durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se realizó la lectura de la fluorescencia emitida en un lector de placas Enspire® Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, España) utilizando una longitud de onda de emisión de 570 nm y una longitud de onda de excitación de 585 nm (Arberas-Jiménez I. y cols. “Laurinterol from *Laurencia johnstonii* eliminates *Naegleria fowleri* triggering PCD by inhibition of ATPases,” Sci. Rep., vol. 10, no. 1, pp. 1–13, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-74729-y).

Ejemplo 4. Evaluación de la inducción de mecanismos de muerte celular programada en *Naegleria fowleri*

Se evaluó la presencia de diferentes eventos metabólicos característicos del proceso de muerte celular programada con el uso de kits comerciales. Para la realización de los ensayos se utilizó la cepa ATCC® 30808™. Las células (5×10^5 células/mL) fueron incubadas con la concentración inhibitoria 90 del producto durante 24 horas a 37°C. Todos los resultados obtenidos fueron comparados con células sanas como control negativo (Rizo-Liendo, A. y cols. “The type 2 statins, cerivastatin, rosuvastatin and pitavastatin eliminate *Naegleria fowleri* at low concentrations and by induction of programmed cell death (PCD)”; Bioorg. Chem., vol. 110, p. 104784, 2021, doi: 10.1016/j.bioorg.2021.104784.)

Ejemplo 5. Actividad in vitro frente a la meningoencefalitis amebiana primaria de la colección de chamigrenos

Los valores de actividad in vitro frente a *Naegleria fowleri* ATCC® 30808™ de la colección de compuestos aislados están representados en la Tabla 1.

- 5 *Tabla 1. Valores de concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) frente a la cepa ATCC® 30808™ de Naegleria fowleri. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar y en µg/mL.*

Compuestos	IC ₅₀
(+)-elatol	0,36 ± 0,03
(-)-etalol	12,27 ± 2,68
(-)-rogiolol	8,18 ± 0,92
(+)-debromoelatol	> 25
(-)-10-bromochamigra-3,7(14)-dien-9-ol	> 25
(+)-obtusol	> 25
(-)-dendroidiol	> 25
(+)-obtusane	> 25
(-)-3,10-dibromo-4-chloro-alpha-chamigreno	> 25
(-)-cartilagineol	> 25
isoobtusol + cartilagineol	> 25
nifedecene + obtusane	> 25

- Los estudios de actividad con la colección de compuestos disponibles han permitido identificar que los chamigrenos, con destaque para el compuesto (+)-elatol, muestran unos excelentes resultados para el tratamiento de la *N. fowleri*.
- 10

Ejemplo 6. Comparación de la actividad in vitro de chamigrenos marinos con fármacos de referencia frente a la meningoencefalitis amebiana primaria

- Se evaluó frente a *Naegleria fowleri* in vitro la actividad y citotoxicidad de (+)-elatol, (-)-elatol y (-)-rogiolol como chamigrenos marinos frente a otros compuestos similares como lauriterol y debromolauriterol, con referencia a anfotericina B y miltefosina.
- 15

- Tabla 2. Valores de concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) frente a las cepas ATCC® 5 30808™ y ATCC® 30215™ de Naegleria fowleri y concentración citotóxica 50 (CC₅₀) frente a macrófagos murinos J774A.1. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar y en µg/mL. IS= índice de selectividad.*
- 20

Compuesto	ATCC® 30808™		ATCC® 30215™		CC ₅₀
	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	
(+)-elatol	0,36 ± 0,03	57,02	0,38 ± 0,06	54,03	20,53 ± 4,33
(-)-etalol	12,27 ± 2,68	4,39	-	-	53,91 ± 4,28
(-)-rogiolol	8,18 ± 0,92	5,57	-	-	45,56 ± 7,80
lauriterol	3,96 ± 0,76	5,97	3,45 ± 0,63	6,85	23,65 ± 2,30
debromolauriterol	5,54 ± 1,19	2,74	14,13 ± 2,37	1,07	15,17 ± 2,80
Anfotericina B	0,11 ± 0,03	> 1818,18	0,15 ± 0,02	> 1333,33	> 200
Miltefosina	15,79 ± 1,72	3,30	33,24 ± 2,95	1,56	52,12 ± 3,61

Los valores de actividad de los chamigrenos activos, y en particular el (+)-elatol, se muestran comparables al fármaco de referencia Anfotericina B. Además, todos se muestran mucho más activos que el compuesto de referencia Miltefosina.

5

REIVINDICACIONES

1. Uso del compuesto (+)-elatol en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección de *Naegleria fowleri* en un sujeto.
5
2. Un uso de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado por que dicha infección es una meningoencefalitis amebiana primaria (MAP).
3. Un uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que dicho
10 sujeto es humano.
4. Un uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que dicho sujeto es un animal.
- 15 5. Compuesto (+)-elatol para su uso en el tratamiento de la enfermedad causada por *Naegleria fowleri*.
6. Composición farmacéutica caracterizada por que comprende elatol y un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de enfermedades causadas por
20 *Naegleria fowleri*.
7. Una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 6, caracterizada por que comprende un principio activo adicional.
- 25 8. Una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 7, caracterizada por que dicho principio activo adicional es un antifúngico.
9. Una composición de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizada por que es una composición de administración intravenosa o nasal.
30
10. Kit que comprende una formulación de elatol y opcionalmente un compuesto adicional donde dicho compuesto es un fungicida, e instrucciones de preparación del agente activo frente a una infección por *Naegleria fowleri*.