

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

## 2013-729

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/03** (2006.01)

**A61P 33/02** (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.09.2013**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **01.04.2015**  
(Věstník č. 13/2015)

(71) Přihlašovatel:  
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Praha 4,  
CZ

(72) Původce:  
Igor Grekov, Praha 6 - Břevnov, CZ  
António Pombinho, Faro, Montenegro, PT  
Matyáš Šíma, Praha 5 - Radotín, CZ  
Tetyana Kobets, Praha 10, CZ  
Petr Bartůněk, Praha 1, CZ  
Marie Lipoldová, Praha 8, CZ

(74) Zástupce:  
Hák Janeček & Švestka, Patentová a známková  
kancelář, Roman Hák, U Průhonu 5, 170 00 Praha 7

(54) Název přihlášky vynálezu:  
**Farmaceutický přípravek obsahující  
difenylenjodonium pro léčení onemocnění  
vyvolaných parazity čeledi  
Trypanosomatidae**

(57) Anotace:  
Řešení se týká nového použití difenylenjodonu (DPI)  
jako účinné látky proti parazitům čeledi  
Trypanosomatidae, zejména proti parazitům rodu  
Leishmania a Trypanosoma.

CZ 2013 - 729 A3

20.09.13

PV 2013-729

P-0093-CZ

**Farmaceutický přípravek obsahující difenylenjodonium pro léčení onemocnění vyvolaných parazity čeledi *Trypanosomatidae***

Oblast techniky

Vynález se týká nového použití difenylenjodonu (DPI) jako účinné látky proti parazitům čeledi *Trypanosomatidae*, zejména proti parazitům rodu *Leishmania* a *Trypanosoma*.

Dosavadní stav techniky

Parazitě rodu *Leishmania* (ničivka) ohrožují obyvatelstvo 98 zemí na 5 kontinentech [Alvar et al. 2012]. Leishmaniáza, nemoc působená těmito parazitickými prvky (patří sem např. *L. aethiopica*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. tropica*) je rozšířena v intertropických zónách Ameriky a Afriky a zasahuje až do mírného pásma Jižní Ameriky, Asie a jižní Evropy. V závislosti na postižené části těla jsou rozlišovány tři typy leishmaniázy: kožní, kožně-slizniční a viscerální. Předpokládá se, že ročně nově onemocní 2 milióny lidí (1.5 miliónu kožní leishmaniázou, půl miliónu viscerální leishmaniázou), a 20000 až 40000 lidí ročně na tuto chorobu umírá, přičemž celkový počet nemocných dosahuje celosvětově 12 miliónů [WHO, 2012]. Protože hlášení případů choroby je povinné pouze v 32 z 98 zemích postižených leishmaniázou, velká část onemocnění není nikde zaznamenána. Choroba však ohrožuje nejen obyvatele endemických zemí, ale také cestovatele [Kobets et al. 2012] a vojenské jednotky umístěné v těchto oblastech. Proti infekci neexistuje účinná lidská vakcína a používané léky mají mnoho nežádoucích vedlejších účinků, v mnohých oblastech proti nim navíc parazité získávají odolnost [Kobets et al. 2012].

Po mnoho let byl vliv leishmaniázy na zdravotní stav obyvatelstva silně podceňován. V posledních 10 letech se endemické oblasti v souvislosti s podnebnými a ekologickými změnami, válečnými konflikty a dalšími neznámými vlivy prudce rozšířily a vzrůstá počet pozorovaných případů. V Evropě se např. leishmaniáza dříve omezovala na oblast Středozevního

moře, ale v současnosti se rozšířila až do severní Itálie a jižního Německa, kde byly zaznamenány desítky případů u lidí, kteří necestovali mimo danou oblast [Kobets et al. 2012], a v poslední době byly hlášeny autochtonní případy nakažených živočichů z Maďarska a ze Švýcarska. Alarmující je také skutečnost, že *Flebotomus* (koutule) - hmyzí přenašeč leishmanií - se šíří severovýchodním směrem rychleji, než předpokládaly dosavadní modely.

Ne každý člověk, nakažený leishmanií, onemocní. Ve středomořské oblasti je např. odhadováno, že na jeden klinický případ připadá 30-100 subklinických infekcí [Pampiglione et al. 1975]. Toto nedoceněné nebezpečí může mít nedozírné následky pro krevní banky. Krev dárců žijících v endemických oblastech Řecka byla seropozitivní na leishmání v 15% případů [Kyriakou et al. 2003] a u dárců z endemické oblasti Španělska (Baleáry) v 11% [Riera et al. 2008]. Tyto asymptomatické infekce se mohou u pacientů s oslabenou imunitou např. při AIDS vyvinout do vážné klinické formy. Koinfekce parazitů *Leishmania* a viru HIV se stává vážným zdravotním problémem v mnoha státech světa, protože infekce HIV zvyšuje riziko náhlého vzplanutí viscerální leishmaniázy 100-2320 x, a infekce leishmaniemi naopak zvyšuje riziko propuknutí AIDS [Kobets et al. 2012].

Ve veterinární medicíně představují vážný problém psi nakažení leishmaniemi. Infikovaní psi obvykle vykazují výrazné symptomy nemoci. Nicméně jak nemocní, tak asymptomatictí psi představují riziko pro člověka, protože jsou rezervoárem parazitů, z něhož jsou hmyzem přenášeni na člověka. V některých oblastech Brazílie je až 24 % psů nakaženo leishmaniemi [Coura-Vital et al. 2011], zatímco v některých částech jižní Evropy ukazuje přítomnost protilátek proti parazitovi, že až 34 % psů se s infekcí setkala [Kobets et al. 2012]. V posledních letech se leishmaniáza objevuje u domácích psů a koček v USA [Petersen, 2009].

Účinná a bezpečná lidská vakcína proti této chorobě neexistuje. Stejně tak neexistuje vhodná a jednoduchá léčba bez vedlejších účinků [Kobets et al. 2012]. Léky používanými v současné době pro léčbu viscerální leishmaniázy [Kobets et al. 2012], které lze použít i proti leishmaniáze kožní a mukokutánní, jsou: pětivalentní antimon, amfotericin B, liposomální amfotericin B, miltefosin a paromomycin. Nejstaršími chemoterapeutiky využívanými pro léčbu viscerální leishmaniázy jsou soli antimonu. V současné době jsou deriváty antimonu sodium stiboglukonát

(Pentostam) a meglumin antimoniat (Glucantime) podávány ve formě nitrosvalových nebo nitrožilních injekcí. Nevýhodou těchto léků je nízká klinická účinnost v některých oblastech, vznik rezistence parazita (až 60 % v indickém státě Bihár), dlouhá doba léčby (30 dnů), toxicita a vysoká cena. Dalšími chemoterapeutiky, účinnými při léčbě leishmaniázy, jsou léčiva, která byla původně vyvinuta pro léčbu jiných nemocí. Je to lék pro boj s plísňovými infekcemi amfotericin B (AmBisome), lék pro léčbu rakoviny miltefosin (Impavido) a širokospektrální antibiotikum paromomycin. Ani tato léčiva však nejsou ideální. Pouze miltefosin je možné podávat *per os*, ale jeho účinnost se snižuje, a v několika případech vedlo jeho podání ke smrti pacientů způsobené vedlejšími účinky působení léku [Sundar et al. 2012]. Amfotericin B a liposomální amfotericin B vyžadují intravenózní infuze a paromomycin je podáván intramuskulárně. I tyto léky mají mnoho vedlejších účinků, s výjimkou paromomycinu jsou drahé a u miltefosinu stačí jedna jediná mutace, aby se parazité stali rezistentními. Nevýhodou je i dlouhá doba léčby [Kobets et al. 2012]. Nevýhody jednotlivých léků lze částečně snížit kombinovanou terapií [van Griensven et al. 2010]. Byla popsána úspěšná léčba podáním jedné dávky liposomálního amfotericinu B v Indii [Sundar et al. 2010], ale tyto nadějně výsledky je třeba ještě potvrdit [Edwards et al. 2011].

K parazitickým prvokům rodu *Trypanosoma* patří zejména *T. brucei* a *T. cruzi*, které vyvolávají spavou nemoc, resp. Chagasovu nemoc.

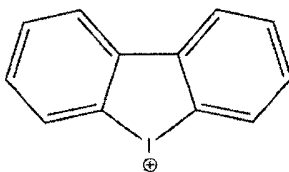
Spavá nemoc (resp. africká trypanosomiáza) je onemocnění člověka vyvolané prvokem *Trypanosoma brucei* a přenášené mouchou (bodalkou) tse-tse. Nemoc je „endemická“ v rozsáhlé oblasti Subsaharské Afriky (zasahující do 36 zemí a osídlené cca 60 milióny lidmi). V roce 2009 bylo podle WHO v Africe odhadováno 30000 nových případů onemocnění. Nemoc existuje ve dvou formách, respektive je způsobena dvěma poddruhy: *Trypanosoma brucei gambiense* v západní a střední Africe a *Trypanosoma brucei rhodesiense* ve východní a jižní Africe, přičemž poddruh uvedený jako druhý je mnohem agresivnější a rychleji působící. K léčbě spavé nemoci se používají v závislosti na fázi léčiva pentamidin, suramin a melarsoprol, které vykazují řadu nežádoucích účinků, mohou vyvolat anemii nebo poškození ledvin. Prevence proti spavé nemoci je prakticky nemožná, neboť neexistuje účinná vakcína.

Chagasova nemoc (tzv. americká trypanosomiáza) je tropické parazitární onemocnění způsobené prvokem *Trypanosoma cruzi*, které je přenášeno pokousáním dravými krev-sajícími plošticemi. Infikovaná ploštice přenese infekci pouze v případě, že během kousnutí vyloučí i infikované výkaly. K přenosu však nemusí dojít pouze pokousáním plošticí. Nemoc může být přenesena krví i z člověka na člověka (například při transfuzi, transplantaci orgánů či během těhotenství může infikovaná matka nakazit své nenarozené dítě). WHO odhaduje, že tímto parazitem je infikováno 7 až 8 miliónů lidí. Inkubační doba je jeden až čtyři týdny (v případě nakažení transfuzí krve se může inkubační doba prodloužit až na 6 týdnů). Nemoc zasahuje zejména srdce, střeva a mozek. Léčba účinkuje jen v počáteční fázi onemocnění a očkování proti nemoci neexistuje. K léčení se užívají léčiva Nifurtimox a Benznidazol, jejich nevýhodou je však značná toxicita, oba léky vyvolávají závažné nežádoucí reakce zažívacího a nervového systému.

*Trypanosoma brucei brucei* vyvolává onemocnění u zvířat (např. koně, velbloudi, vodní buvoli), ale nikoliv u lidí.

Ze všech výše uvedených údajů je zřejmé, že existuje potřeba nového léku s účinky proti parazitickým prvokům čeledi *Trypanosomatidae*, který by nevyžadoval komplikovanou léčbu, měl méně vedlejších účinků než současně používané léky, a byl by cenově dostupný v postižených oblastech.

Difenylenjodonium ([1,1'-bifenyl]-2,2'-diyljodonium, DPI) je látka mající následující vzorec:



Bylo ukázáno, že difenylenjodoniumsulfát u potkanů zabránil alkoholem-vyvolanému poškození jater [Kono et al. 2001]. WO 2007/080598 popisuje farmaceutickou kompozici obsahující DPI nebo jeho sůl pro inhibici proliferace neointimy a prevenci restenózy. WO 2012/135588 popisuje použití difenylenjodoniumchloridu jako chemoterapeutika při léčení serózních nádorů.

O DPI byla již dříve publikována informace, že zabíjí malarického parazita *Plasmodium falciparum* ( $IC_{50} = 0,001 - 0,00006 \mu M$ ) [Yuan et al. Nat Chem Biol 5: 765-771, 2009].

Účinek DPI proti parazitům čeledi *Trypanosomatidae* nebyl dosud znám.

#### Podstata vynálezu

Původci testovali knihovnu 2448 chemických sloučenin zahrnujících kolekce „Library of Pharmacologically Active Compounds“ (LOPAC1280, Sigma-Aldrich), „Prestwick Chemical Library“ (Illkirch, France) a „NIH Clinical Collection“ (NIH, USA). Sloučeniny byly použity pro skríníng na inhibici růstu parazita *Leishmania major*. V tomto primárním skríníngu bylo difenyljenodonium (DPI) určeno jakožto účinný inhibitor.

V dalších testech původci překvapivě našli u sloučeniny DPI významné účinky proti parazitům *Leishmania* ssp. a *Trypanosoma brucei brucei*. V testech, které byly součástí sekundárního skríníngu a jsou podrobně popsány v sekci „Příklady“, bylo ukázáno, že DPI účinně inhibuje růst parazitů rodu *Leishmania* ve formě promastigotů (forma žijící v hmyzím přenašeči). Byla stanovena hodnota  $IC_{50} = 0,010 \mu M$ , která je významně nižší než hodnota pro současná léčiva, jako je například amfotericin B ( $IC_{50} = 0,039 \mu M$ ). Navíc je DPI také účinný v zabíjení parazitů rodu *Leishmania* ve formě amastigotů (forma nacházející se v makrofázích), kdy byla zjištěna hodnota  $LD_{50} = 0,066 \mu M$ , která je také nižší než hodnota pro nejlepší současné léčivo amfotericin B ( $LD_{50} = 0,143 \mu M$ ).

Dále bylo v testech *in vivo* u infikovaných myší prokázáno, že podávání DPI vedlo k významnému snížení počtu parazitů ve slezinách infikovaných myší.

V testech bylo také prokázáno, že krevní forma parazita *Trypanosoma brucei brucei* je zabíjena působením DPI s vysokou účinností, byla zjištěna hodnota  $LC_{50} = 0,85 \mu M$ .

DPI tedy může být tedy užitečný jako léčivo pro léčení onemocnění vyvolaných parazity čeledi *Trypanosomatidae*, výhodně parazity rodu *Leishmania* nebo *Trypanosoma*, konkrétně např. onemocnění vyvolaných parazity *Leishmania major* nebo *Trypanosoma brucei brucei*.

Jeden aspekt vynálezu se tedy týká difenylenjodonia nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro použití při léčení onemocnění vyvolaných parazity z čeledi *Trypanosomatidae*. Výhodné je použití při léčení onemocnění, které je vyvoláno parazity rodu *Leishmania* nebo *Trypanosoma*. Výhodnější je použití při léčení onemocnění vyvolaného parazitem *Leishmania major*. V jiném výhodnějším aspektu se použití týká léčení onemocnění vyvolaného parazitem *Trypanosoma brucei brucei*.

Další aspekt vynálezu se týká použití difenylenjodonia nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutického přípravku pro léčení onemocnění vyvolaných parazity z čeledi *Trypanosomatidae*. Výhodně se použití týká léčení onemocnění, které je vyvoláno parazity rodu *Leishmania* nebo *Trypanosoma*. V jednom konkrétním provedení se použití týká léčení onemocnění vyvolaného parazitem *Leishmania major*. V jiném konkrétním provedení se použití týká léčení onemocnění vyvolaného parazitem *Trypanosoma brucei brucei*.

Farmaceutický přípravek obsahující DPI nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl je užitečný pro léčení v humánní i veterinární medicíně. Léčením se přitom rozumí jak profylaxe, tak vlastní (kurativní) léčení.

Ve farmaceutickém přípravku může být DPI přítomen také ve formě farmaceuticky přijatelných solí (netoxických, fyziologicky přijatelných), anorganické či organické povahy. Odborník je schopen rutinně připravit vhodné soli.

Farmaceutické přípravky obsahující jako účinnou látku DPI nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl mohou být formulovány např. pro systémové podávání, např. enterální podávání, jako např. perorální podávání, např. ve formě tablet nebo tobolek, pro rektální podávání, např. ve formě čípků, pro nasální podávání či inhalaci, např. ve formě spreje nebo kapek. Léčiva mohou být výhodně formulována také pro parenterální podávání, jako injekcí (i.v., i.m., s.c.), infúzí nebo

pomocí implantovatelného zásobníkového systému. Odborníkovi je zřejmé, že tento výčet není vyčerpávající, a odborník zná další vhodné způsoby.

Účinná látka je ve farmaceutickém přípravku zpravidla společně s pomocnými látkami jako jsou např. plnidla, rozvolňovadla, ředidla, pojidla, emulgátory, pufry, stabilizující činidla, konzervanty a barviva. Tak farmaceutický přípravek podle vynálezu obsahuje účinnou látku a jednu nebo více pomocných látek. Odborníkovi jsou známy pomocné farmaceutické látky a jejich použití při formulaci farmaceutických přípravků.

DPI může být ve farmaceutickém přípravku také v kombinaci s jinou účinnou látkou, např. výhodně s účinnou látkou projevující synergický účinek.

DPI bude zpravidla formulován do farmaceutického přípravku ve farmaceuticky účinném množství. Způsob stanovení farmaceuticky účinného množství je běžným postupem, který je odborníkovi znám.

Stanovení dávky účinné látky obsažené v jednotkové lékové formě např. v případě tobolek nebo např. vhodné koncentrace v případě injekčního nebo infúzního roztoku je také běžným postupem odborníkovi známým.

Výše zmíněné znalosti odborníka týkající se farmaceutických přípravků, lékových forem, pomocných látek apod. jsou shrnuty v odborných příručkách [Gennaro, A.R. et al. Remington: The Science and Practice in Pharmacy. 20. vydání. Lippincot Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, Kibbe, A.H. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Pharmaceutical Press, London, 2000, Chalabala, M. et al. Technologie Léků. Galén, Praha, 2001], případně také v Českém lékopisu (ČL 2009), v Evropském lékopisu (Ph.Eur.) a/nebo lékopisu Spojených států (USP).

#### Popis obrázků

**Obr. 1.** Účinek DPI proti parazitu *Leishmania major* ve formě promastigotů (A), včetně kmenů odolných proti solím antimonu (B)

**Obr. 2.** Účinek DPI na *Leishmania major* ve formě amastigotů (forma, která žije v makrofázích hostitele)

**Obr. 3.** Účinek DPI *in vivo* na snížení počtu parazitů ve slezinách infikovaných myší

**Obr. 4.** Účinek DPI na krevní formu parazita *Trypanosoma brucei brucei*

**Obr. 5.** Stanovení účinku DPI na životaschopnost lidských buněk

#### Příklady provedení vynálezu

##### **Příklad 1**

##### **Primární skríníng**

DPI bylo nalezeno při testování knihovny 2448 chemických sloučenin zahrnujících „Library of Pharmacologically Active Compounds“ (LOPAC1280, Sigma-Aldrich), „Prestwick Chemical Library“ (Illkirch, France) a „NIH Clinical Collection“ (NIH, USA). Sloučeniny byly reformátovány do 384-jamkových polypropylenových destiček (Corning, kat. č. 3657) v konečné koncentraci 1  $\mu\text{M}$  v DMSO a použity pro skríníng na inhibici růstu parazita *Leishmania major*.

Výsledkem primárního skríníngu bylo zjištění, že DPI je účinným inhibitorem růstu parazita *Leishmania major*. DPI bylo proto dále testováno *in vitro* a *in vivo*, jak je popsáno v dalších příkladech.

## Příklad 2

### Cytostatický účinek DPI na *Leishmania major* ve formě promastigotů (obr. 1A, 1B)

Antiparazitární aktivita v kultuře promastigotů (hmyzí forma) byla měřena pomocí standardní mikrodiluční metody, určující minimální inhibiční koncentraci (MIC) testovaného vzorku, která vede k inhibici parazitárního růstu.

*Leishmania major* LV 561 (MHOM/IL/67/LRC-L137 JERICHO II) byla uchovávána v převrstvení 10% dimethylsulfoxidem v tekutém dusíku jako subkultura 0. Paraziti byli rozmrazeni a kultivováni 7 dní při 23 °C ve dvoufázovém médiu SNB-9 (saline-neopeptone-blood-9) [Grekov et al. 2011]. Pevná fáze a převrstvení SNB-9 byly připraveny z následujících složek: Bacto™ Agar (kat. č. 214010, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ), Bacto™ Neopeptone (kat. č. 211681, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ), NaCl a defibrinovaná králíčí krev (Bioveta, a. s., Ivanovice na Hané, Czech Republic). Do převrstvujícího roztoku byl přidán 50 µg/ml gentamicin (kat. č. G1272, Sigma, St. Louis, MO). Pro testy inhibice růstu promastigotů byla subkultura 2 *L. major* kultivována ve Schneiderově hmyzím médiu (kat. č. S0146, Sigma, St. Louis, MO) doplněném 50 µg/ml gentamicinu (kat. č. G1272, Sigma, St. Louis, MO), 63,7 µg/ml penicilinu G (kat. č. PENK, Sigma, St. Louis, MO), 100 µg/ml streptomycinu (kat. č. S6501, Sigma, St. Louis, MO), 2% lidská moč a 10% tepelně-inaktivované fetální bovinní sérum (kat. č. F2442, Sigma, St. Louis, MO).

Leishmanie ve formě promastigotů nacházejících se v logaritmické fázi růstu byly rozplněny do černých 384-jamkových destiček (kat. č. 3571, Corning, New York, NY) v koncentraci 15000 parazitů/µl/jamka s použitím přístroje Multidrop Combi (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). Ihned poté byly přidány DPI (1 nM – 500 nM) nebo Amfotericin B (20 nM – 10 µM) pomocí „pitool” zapojeným k JANUS® Automated Workstation (PerkinElmer Inc., Waltham, MA) a inkubovány po 48 hodin. Metabolická kapacita parazitů byla měřena po 2,5 hodinách inkubace pomocí činidla CellTiter-Blue® Reagent (kat. č. G8082, Promega Corporation, Madison, WI) s použitím čtečky EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer Inc., Waltham, MA). Data byla vyhodnocena pomocí (log(inhibitor) vs. odpověď – variabilní sklon). Příprava grafů a

výpočet  $IC_{50}$  byly provedeny pomocí programu GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, USA). Hodnota  $IC_{50}$  byla vypočítána jako koncentrace DPI, při níž došlo ke snížení počtu životaschopných promastigotů o 50 %, a to metodou nelineární regrese (hodnoty uvedeny dále v tab. 1).

Účinek DPI proti parazitu *Leishmania major* ve formě promastigotů, stanovený výše popsaným způsobem, je graficky znázorněn na obr. 1. Obrázek ukazuje procento živých promastigotů *L. major* v kulturách, na něž působil DPI nebo amfotericin B ve srovnání s kulturou, na níž tyto látky nepůsobily (brána jako 100%).

#### **Cytotoxický účinek DPI na *Leishmania major* ve formě amastigotů (forma nacházející se v makrofázích) (obr. 2)**

Prekurzory makrofágů byly izolovány z kostní dřeně a inkubovány 7 dnů při 37 °C a 5%  $CO_2$  v médiu DMEM suplementovaném (doplněným) supernanantem L929 buněk (20 objemových procent) obsahujícím M-CSF. Po diferenciaci byly makrofágy infikovány E-GFP- *L. major* ve stacionární fázi růstu v poměru 1:10. Poté byly makrofágy inkubovány v suplementovaném médiu DMEM doplněným (20% objemu) supernanantem L929 buněk obsahujícím M-CSF při 37 °C a 5%  $CO_2$ . Po 24 hodinách bylo médium obsahující extracelulární parazity odstraněno a destičky byly 3x odmyty médiem HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, kat. č. H9269, Sigma, St. Louis, MO). V poslední fázi bylo HBSS nahrazeno suplementovaným DMEM a vzorky byly inkubovány dalších 24 hodin, aby se mohli promastigoti transformovat v amastigoty. Pak byly přidány testované látky v koncentracích 7,8 nM až 2  $\mu$ M. Po 48 hodinách koinkubace s látkami byly makrofágy obarveny 1  $\mu$ g/ml Laser Dye Styryl-751 (LDS-751) ve tmě při pokojové teplotě po 30 minut. Poté bylo médium odsáto, makrofágy byly odmyty z destičky studeným PBS obsahujícím 10 mM glukózy (kat. č. G5400, Sigma, St. Louis, MO) a 3 mM EDTA (kat. č. ED, Sigma, St. Louis, MO) a přeneseny do destiček s kulatým dnem (kat. č. 3365, Corning, New York, NY).

Vzorek byl analyzován na průtokovém cytometru FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) pomocí softwaru CellQuest Pro (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). Použité detektory: Forward Scatter (FSC) (přímý rozptyl), Side Scatter (SSC) (boční rozptyl), FL1 (emise při  $530 \pm 15$  nm) detektor pro GFP, FL3 (emise při  $> 670$  nm – „longpass filter“) detektor pro LDS-751. Měřeny byly výsledky pro 10 000 makrofágů v prvním pokuse a pro 20 000 makrofágů v druhém pokuse. Mrtvé buňky, negativní na LDS-751, byly vyloučeny z analýzy. Výsledky byly zpracovány s použitím nelineární regrese ( $\log(\text{inhibitor})$  vs. odpověď - variabilní sklon).

Výsledky výše popsaného testu jsou graficky znázorněny na obr. 2.

Pro ověření výše uvedených výsledků získaných průtokovou cytometrií (FCM) byly připraveny buněčné nátěry ze suspenze peritoneálních makrofágů ošetřených DPI v koncentracích 2,7 nM, 24,7 nM, 0,2222  $\mu$ M a 2,0  $\mu$ M. Nátěry byly obarveny pomocí Giemsa (kat. č. 11700, Sigma, St. Louis, MO) a analyzovány fluorescenčním mikroskopem Leica6000DM (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) při zvětšení  $\times 400$ . Byl stanoven celkový počet parazitů v 500 makrofázích. Výsledky byly zpracovány s použitím nelineární regrese („one phase exponential decay“).

Hodnota  $LD_{50}$  byla jak pro průtokovou cytometrii, tak pro buněčné nátěry vypočítána jako koncentrace látky, při níž došlo ke snížení počtu infikovaných makrofágů o 50%. Grafy byly vytvořeny a hodnota  $LD_{50}$  počítána pomocí GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, USA). Hodnoty  $IC_{50}$  a  $LD_{50}$  jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tab. 1.** Hodnoty  $IC_{50}$  a  $LD_{50}$  určené z experimentů, jejichž výsledky jsou znázorněny na obr. 1A, 1B a 2. Amph B = amfotericin B

|                                                                                           | DPI   | Amph B |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------|--------|
| <i>L. major</i> ve formě promastigotů ( $IC_{50}$ , $\mu M$ )                             | 0,010 | 0,039  |
| <i>L. major</i> odolné proti solím antimonu ve formě promastigotů ( $IC_{50}$ , $\mu M$ ) | 0,015 | 0,043  |
| <i>L. major</i> ve formě vnitrobuněčných amastigotů ( $LD_{50}$ , $\mu M$ )               | 0,066 | 0,143  |

Testy prokázaly, že DPI je účinný v inhibici růstu parazitů rodu *Leishmania* ve formě promastigotů (forma žijící v hmyzím přenašeči). Hodnota  $IC_{50} = 0,010 \mu M$  je významně nižší než hodnota pro současná léčiva jako je amfotericin B ( $IC_{50} = 0,039 \mu M$ ).

Dále bylo prokázáno, že DPI je účinný v zabíjení parazitů rodu *Leishmania* také ve formě amastigotů (forma nacházející se v makrofázích). Stanovená hodnota  $LD_{50} = 0,066 \mu M$  pro DPI je významně nižší než hodnota pro amfotericin B ( $0,143 \mu M$ ).

### Příklad 3

#### Působení DPI *in vivo* (Obr. 3)

Samice kmene BALB/c (stáří 8-11 týdnů) byly náhodně rozděleny do čtyř experimentálních skupin po 8-9 zvířatech: 1) neinfikované kontroly; 2) infikované neléčené kontroly; 3) podávání 2,5 mg/kg/den (MKD) amfotericinu B; 4) podávání 0,5 MKD DPI. Promastigoti *L. major* ( $10 \times 10^6$ ) ze 7-denní subkultury 2 byli podkožně inokulováni v 50  $\mu l$  sterilního fyziologického roztoku (PBS) ke kořenu myšího ocasu. Neinfikované kontrolní myši byly inokulovány sterilním fyziologickým roztokem. Aplikace standardní léčivé látky (amfotericin B) a testované látky (DPI) začala 2. týden po infekci, kdy se u většiny myší vyvinuly na místě vpichu parazitů boule. Během následujících 28 dní byla skupině 3 podávána denně ve formě intraperitoneální injekce

standardní léčivá látka amfotericin B a skupině 4 injekce DPI v 20% DMSO v PBS, a skupinám 1 a 2 stejný objem 20% DMSO v PBS. Velikost kožní léze byla měřena jednou týdně pomocí posuvného měřítka. Myši byly usmrceny 6 týdnů po infekci. Slezina byla odebrána na analýzu. Počet parazitů ve slezině byl určen pomocí PCR-ELISA podle postupu publikovaném v Kobets et al., Nature Protocols, 5(6):1074-80, 2010. Stručně, celková DNA byla izolována pomocí standardní procedury (<http://www.mrcgene.com/tri.htm>) TRI reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, USA). Pro PCR amplifikaci byly použity primery: digoxigeninem značený primer F 5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3' a biotinem značený primer R 5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3' (VBC Genomics Biosciences Research, Austria), které cílí na 120 bp dlouhý konzervativní úsek DNA na kinetoplastovém mikrokroužku parazita *Leishmania*. V každé reakci bylo použito 50 ng izolované DNA. Jako pozitivní kontrola bylo použito 20 ng DNA *L. major* na reakci a amplifikát sloužil jako nejvyšší koncentrační standard. Byla provedena PCR amplifikace s 30 cykly. Množství parazitů bylo určeno analýzou PCR produktu pomocí modifikované protokolu ELISA (Pharmingen, San Diego, USA). Koncentrace DNA leishmanií byla vyhodnocena s použitím přístroje ELISA Reader Tecan a programu KIM-E (Schoeller Pharma, Prague, Czech Republic), ve kterém byla vyhodnocena kalibrační křivka metodou lineární regresní analýzy nejmenších čtverců.

Účinek DPI *in vivo* na snížení počtu parazitů *L. major* ve slezinách infikovaných myší je znázorněn na obr. 3.

Ve výše popsaném testu *in vivo* u infikovaných myší bylo prokázáno, že podávání DPI vedlo ke statisticky významnému snížení počtu parazitů ve slezinách infikovaných myší, a to na srovnatelnou úroveň jako při podávání standardního léčiva amfotericinu B.

#### Příklad 4

##### Účinek DPI na krevní formu parazita *Trypanosoma brucei brucei* (Obr. 4)

*Trypanosoma brucei brucei* AnTar1 byla dar od Jana van den Abbeele, Institute of Tropical Medicine “Prince Leopold”, Antwerpy, Belgie. Parazité byli uchováváni v tekutém dusíku a před pokusem byli rozmrazeni a použiti pro infekci myši pomocí intraperitoneální inokulace. Šest až sedm dní po infekci byly infikované myši zabity cervikální dislokací, krev byla odebrána z hrudní dutiny po disrupci aorty a smíšena v poměru 1:5 s Iscove modifikovaným médiem (HMI)-11 (kat. č. I6529, Sigma, St. Louis, MO) s přídavkem 1,5 mM L-cysteinu, 0,2 mM 2-merkptoethanolu, 1 mM sodiumpyruvátu, 0,16 mM thymidinu, 100 µg/ml streptomycinu, 63,7 µg/ml penicilinu G a 20 % tepelně inaktivovaného FBS [Hirumi & Hirumi, 1989]. Suspenze byla centrifugována při 200 g 5 minut při 4 °C a supernatant byl odebrán. Počet krevních forem *T. brucei brucei* v supernatantu byl určen počítáním v Bürkerově komůrce. Kultura pak byla naředěna v HMI-11 do hustoty  $4 \times 10^6$  parazitů/ml a paraziti byli kultivováni 3 hodiny při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> v 48-jamkových kultivačních destičkách (Costar, kat. č. 3548), 0,5 ml/jamka. Poté byly destičky pokryty parafilmem, aby nedocházelo k výměně plynů, a kultivovány přes noc při 37 °C. Dalších 24 hodin parazité přežívali při přibližně stejné hustotě a mohli být použiti k testování antiparazitických účinků DPI.

Pro stanovení antiparazitických účinků DPI byly paraziti kultivováni dle popsaného postupu. K testovaným kulturám bylo na začátku kultivace přidáno DPI v různých výsledných molárních koncentracích (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 a 9 µM). Paralelně byly testovány kultury se stejnými koncentracemi Pentamidinu (draselná sůl pentamidinu), který sloužil jako referenční látka (jedná se o standardně využívané léčivo), a kultury bez přídavku léčivé látky jako kontrola. Byly provedeny dva nezávislé experimenty a v každém z nich probíhaly jednotlivé kultivace v dubletech. Počty živých parazitů (pohyblivé buňky) v jednotlivých kulturách byly po 24 h kultivace spočítány v Bürkerově komůrce.

Účinek DPI na krevní formu parazita *Trypanosoma brucei brucei* je graficky znázorněn na obr. 4. U DPI byla zjištěna hodnota  $LC_{50}=0,85 \mu M$ , což je více než u referenční látky Pentamidin

( $LC_{50}=0,14 \mu M$ ), nicméně je zajímavé, že DPI působí jak na parazita *Leishmania*, tak i na příbuzného parazita *Trypanosoma*. To ukazuje na fakt, že DPI může působit na mechanismus společný těmto parazitům. Jako  $LC_{50}$  byla označena koncentrace látky, která způsobí úbytek živých parazitů na polovinu oproti negativní kontrole. Hodnoty  $LC_{50}$  byly odvozeny z křivky  $\log(\text{inhibitor})$  vs. odpověď (tři parametry) v programu GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA). Tato křivka byla vybrána jako vhodná pro proložení naměřených dat. Křivka byla daty proložena metodou analýzy nejmenších čtverců.

## Příklad 5

### Stanovení cytotoxicity DPI pro lidské buňky (Obr. 5)

Lidské buňky CCD 841 (buňky střevního epitelu) a MRC5 (fetální plicní fibroblasty) v odpovídajících růstových médiích byly rozplněny do černých 384-jamkových destiček (Corning, kat. č. 3571) v hustotě 15000 buněk/25  $\mu l$ /jamka s použitím Multidrop Combi (Thermo Scientific). Po 48 hodinách inkubace při 37 °C a 5%  $CO_2$  byla stanovena viabilita buněk pomocí komerčního testu CellTiter Blue Cell Viability Assay (Promega, kat. č. G8082). Cytotoxicita byla stanovena po 4 hodinách ve 37 °C a 5%  $CO_2$  pomocí komerčního testu CytoTox-ONE Homogenous Membrane Integrity Assay (Promega, kat. č. G7892). Fluorescenční intenzita byla měřena na detektoru (čtečce) EnVision, Perkin Elmer a naměřená data byla analyzována pomocí softwaru Prism5 (GraphPad Software, Inc.).

Životaschopnost buněk v závislosti na koncentraci DPI je znázorněna na obr. 5. Koncentrace DPI, ve kterých se projevila průkazný antiparazitický účinek, v rozmezí 9,8 nM – 1,25  $\mu M$  (viz příklady 1 a 2), nevykazovaly negativní účinek na životaschopnost lidských buněk CCD 841 a MRC5. Antiparaziticky účinné koncentrace DPI tedy nejsou cytotoxické pro lidské buňky.

## Literatura

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; the WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7(5):e35671.
- Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Reis LE, Braga SL, Morais MH, Reis AB, Carneiro M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5(8):e1291.
- Edwards T, Omollo R, Khalil EA, Yifru S, Musa B, Musa A, Wasunna M, Smith PG, Royce C, Ellis S, Balasegaram M, Hailu A. Single-dose liposomal amphotericin B (AmBisome®) for the treatment of visceral leishmaniasis in East Africa: study protocol for a randomized controlled trial. Trials. 2011;12:66.
- Grekov I, Svobodová M, Nohýnková E, Lipoldová M. Preparation of highly infective *Leishmania* promastigotes by cultivation on SNB-9 biphasic medium. J Microbiol Methods. 2011 Dec;87(3):273-7.
- Hirumi H, Hirumi K. Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. J Parasitol. 1989 Dec;75(6):985-9.
- Kobets T, Badalová J, Grekov I, Havelková H, Svobodová M, Lipoldová M. *Leishmania* parasite detection and quantification using PCR-ELISA. Nat Protoc. 2010 Jun;5(6):1074-80.
- Kobets T, Grekov I, Lipoldova M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. Curr Med Chem. 2012;19(10):1443-74.
- Kono H, Rusyn I, Uesugi T, Yamashina S, Connor HD, Dikalova A, Mason RP, Thurman RG. Diphenyleneiodonium sulfate, an NADPH oxidase inhibitor, prevents early alcohol-induced liver injury in the rat. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001 May;280(5):G1005-12.
- Kyriakou DS, Alexandrakis MG, Passam FH, Kourelis TV, Foundouli P, Matalliotakis E, Maniatis AN. Quick detection of *Leishmania* in peripheral blood by flow cytometry. Is

prestorage leucodepletion necessary for leishmaniasis prevention in endemic areas? Transfus Med. 2003;13(2):59-62.

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

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

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

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

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

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

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

20.09.13

PV 2013-729

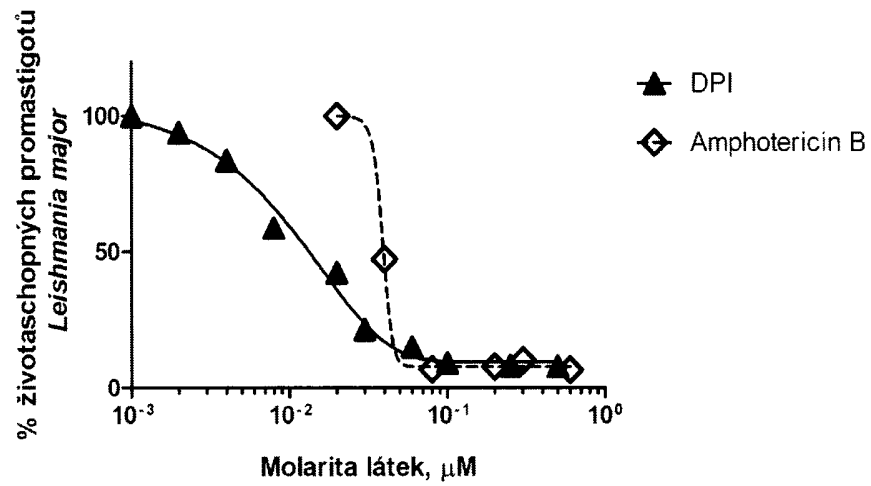
### PATENTOVÉ NÁROKY

1. Difenylenjodonium nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl pro použití při léčení onemocnění vyvolaných parazity z čeledi *Trypanosomatidae*.
2. Difenylenjodonium nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl pro použití při léčení onemocnění vyvolaných parazity rodu *Leishmania*.
3. Difenylenjodonium nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl pro použití při léčení onemocnění vyvolaného parazitem *Leishmania major*.
4. Difenylenjodonium nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl pro použití při léčení onemocnění vyvolaných parazity rodu *Trypanosoma*.
5. Difenylenjodonium nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl pro použití při léčení onemocnění vyvolaného parazitem *Trypanosoma brucei brucei*.
6. Použití difenylenjodonia nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutického přípravku pro léčení onemocnění vyvolaných parazity z čeledi *Trypanosomatidae*.
7. Použití podle nároku 6, kdy onemocnění je vyvoláno parazity rodu *Leishmania*.
8. Použití podle nároku 7, kdy onemocnění je vyvoláno parazitem *Leishmania major*.
9. Použití podle nároku 6, kdy onemocnění je vyvoláno parazity rodu *Trypanosoma*.
10. Použití podle nároku 9, kdy onemocnění je vyvoláno parazitem *Trypanosoma brucei brucei*.

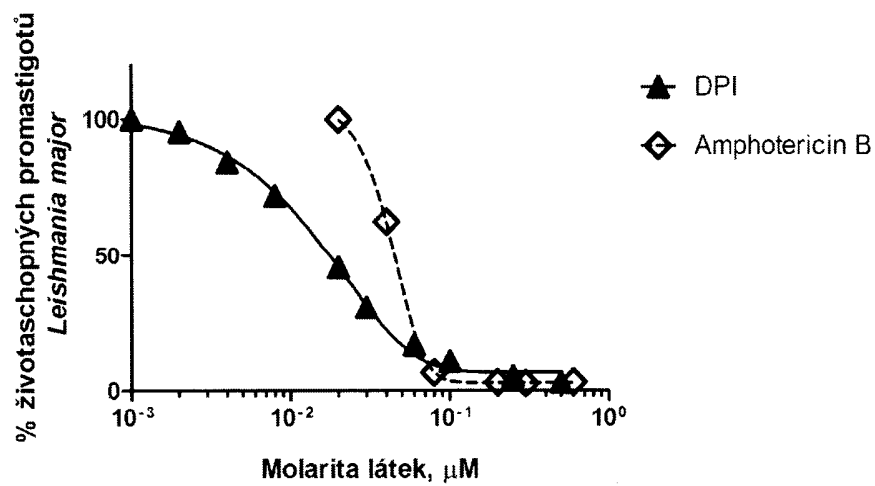
20.09.13  
PV 2013-229

1/3

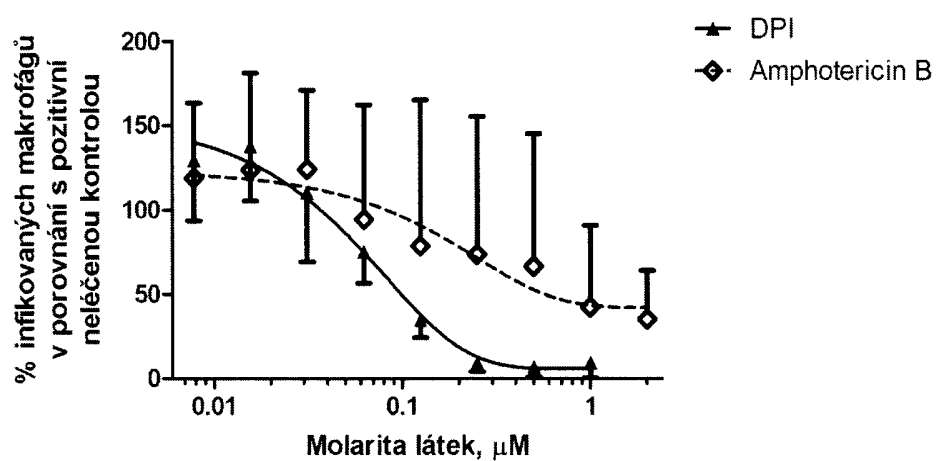
Obr. 1A



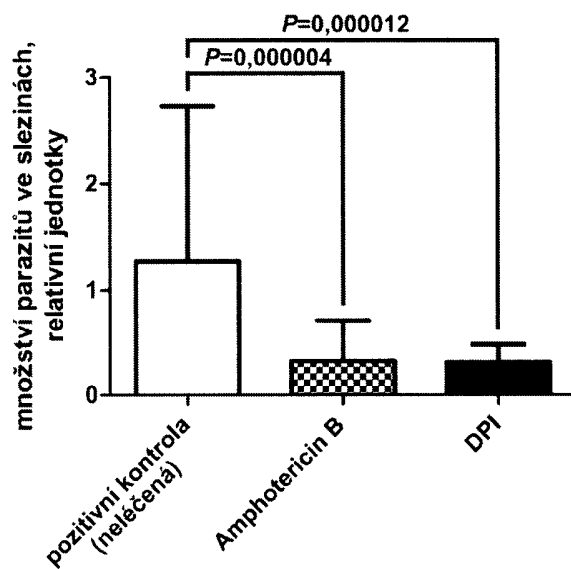
Obr. 1B



Obr. 2

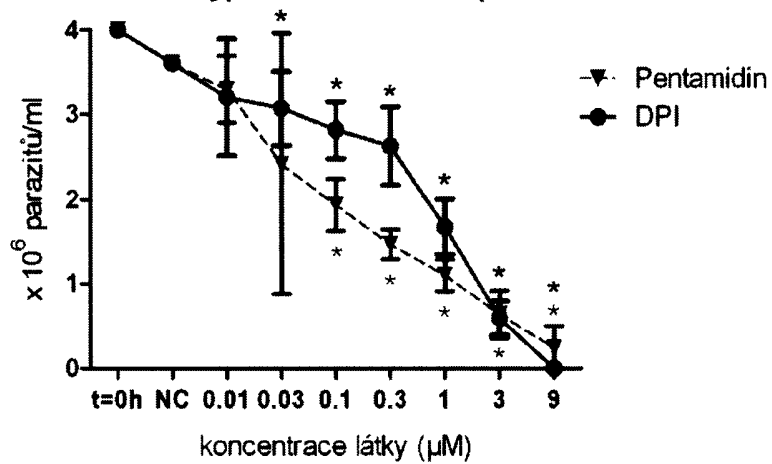


Obr. 3



Obr. 4

Efekt DPI a Pentamidinu na kulturu krevních  
forem *Trypanosoma brucei* po 24 h



$\text{LC}_{50} = 0,85 \mu\text{M}$

Obr. 5

