



# Estudis d'interacció de tensioactius sintètics biocompatibles amb models de membrana. Potencial aplicació en medicina pulmonar

Neus Lozano Valdés

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



***Estudis d'Interacció de Tensioactius Sintètics  
Biocompatibles amb Models de Membrana.  
Potencial Aplicació en Medicina Pulmonar.***



Tesi doctoral dirigida per:

*Dra. Aurora Pinazo Gassol / Dr. Ramon Pons Pons*

**Neus Lozano Valdés**

Barcelona, Gener 2010

Programa de Doctorat “*Ciència i Tecnologia de Col·loides i Interfases*”

Bienni 2005-2007



## *11. Apèndixs*

---



*Apèndix I - Sol·licitud de patent ES1641.261*



**Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente**

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P200930990	
Fecha de recepción:	13 noviembre 2009, 14:40 (CET)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1641.261	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	FORMULACIONES DE LIPOAMINOÁCIDOS CATIONICOS CON MENOR PODER HEMOLÍTICO BASADAS EN LA FORMACIÓN DE PARES CATANIONICOS.	
Documentos enviados:	Descripcion-1.pdf (15 p.) Reivindicaciones-1.pdf (3 p.) Dibujos-1.pdf (6 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) FEERCPT-1.pdf (1 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84921709 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	13 noviembre 2009, 14:40 (CET)	
Codificación del envío:	98:2F:A6:4B:85:CE:B0:A6:27:79:C4:98:ED:15:34:BB:51:5E:52:57	

/Madrid, Oficina Receptora/



MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

(1) MODALIDAD:	<b>PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD</b>	<input checked="" type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
(4) LUGAR DE PRESENTACION: LUGAR		OÉPM, Presentación Electrónica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL:  NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME:  DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO:  MODO DE OBTENCION DEL DERECHO:  INVENCION LABORAL: CONTRATO: SUCESION:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)  España ES Q2818002D  C/ SERRANO, 117 MADRID 28 Madrid 28006 España ES  <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	PONS PONS RAMON España ES
(6-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	PINAZO GASSOL AURORA España ES
(6-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	LOZANO VALDÉS NEUS España ES
(6-4) INVENTOR 4:	APELLIDOS:	RIVAS LÓPEZ

(6-5) INVENTOR 5:	NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	LUIS IGNACIO España ES
(6-6) INVENTOR 6:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	FERNÁNDEZ-REYES SILVESTRE MARIA DEL ROSARIO España ES
(6-7) INVENTOR 7:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	LUQUE ORTEGA JUAN ROMÁN España ES
(6-8) INVENTOR 8:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	PÉREZ MUÑOZ LOURDES España ES
(6-9) INVENTOR 9:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	MORÁN BÁDENAS CARMEN España ES
(7) TÍTULO DE LA INVENCION:		FORMULACIONES DE LIPOAMINOACIDOS CATIONICOS CON MENOR PODER HEMOLÍTICO BASADAS EN LA FORMACIÓN DE PARES CATIONICOS.
(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO	<input checked="" type="checkbox"/>
(9) SOLICITA LA INCLUSION EN EL PROCEDIMIENTO ACCELERADO DE CONCESIÓN	SI NO	<input checked="" type="checkbox"/>
(10) EFECTUADO DEPOSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI NO	<input checked="" type="checkbox"/>
(11) DEPOSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCION DE DEPOSITO: NÚMERO DE DEPOSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	
(12) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:	LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS	<input type="checkbox"/>
(13) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:	
(14) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN:	



	CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(15) AGENTE/REPRESENTANTE:	APELLIDOS: NOMBRE:  NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE:  DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO:  NÚMERO DE PODER:	PONS ARIÑO ANGEL  España ES 50534279-J  GLORIETA DE RUBEN DARJO, 4 MADRID 28 Madrid 28010 España ES      20081765
(16) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPANAN:	DESCRIPCIÓN: REIVINDICACIONES:  DIBUJOS: RESUMEN: FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: JUSTIFICANTE DE PAGO (1): LISTA DE SECUENCIAS PDF: ARCHIVO PARA LA BÚSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):	<input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 15 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 12 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input type="checkbox"/> N.º de figura(s): <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/>
(17) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:	DOC COPIA DNI: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: DOC COPIA OTROS:	<input type="checkbox"/>  <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:
(18) NOTAS:		
(19) FIRMA DIGITAL:	FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:   LUGAR DE FIRMA: FECHA DE FIRMA:	ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84921709 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J MADRID 13 Noviembre 2009

2

**FORMULACIONES DE LIPOAMINOÁCIDOS CATIONICOS CON MENOR PODER HEMOLÍTICO BASADAS EN LA FORMACIÓN DE PARES CATIONICOS.**

5

**DESCRIPCION**

La presente invención se refiere a una composición formada por un tensioactivo catiónico que es un diacilglicerol derivado de arginina y al menos un fosfolípido y a su uso como antibacteriano y antifleishmanico.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

15 Los diacilglicerol derivados de arginina se sintetizaron con el objetivo de mejorar y abaratar los tensioactivos antimicrobianos existentes. Su uso en alimentos y aplicaciones cosméticas, así como desinfectantes tópicos, han sido estudiados ampliamente (Vinardell, M.P.; Benavides, T.; Mijang, M.; Infante, M.R.; Clapes, P.; Clothier, R. *Food Chem Toxicol* **2008**, *46*, 3637-3641). La estructura de estos compuestos consiste en un esqueleto central formado por el glicerol, una parte hidrófoba formada por ácidos alifáticos unidos al glicerol en las posiciones 1 y 2 mediante enlaces éster y una parte de carácter polar formada por un residuo de arginina unido al glicerol en la posición 3 mediante un enlace éster (Pérez, L.; Infante, M.R.; Angelet, M.; Clapes, P.; Pinazo, A. *Prog Colloid Polym Sci* **2004**, *123*, 210-216; Pérez, L.; Infante, M.R.; Pons, R.; Moran, M.C.; Vinardell, P.; Mijang, M.; Pinazo, A. *Colloids Surf B* **2004**, *35*, 235-242). Estructuralmente se pueden considerar análogos de fosfolípidos con una funcionalidad mixta entre los liposaminocidos y triglicéridos. Además, la inclusión de un aminoácido favorece su biodegradabilidad. La modulación de sus propiedades físico-químicas, y por tanto de sus actividades biológicas asociadas, (Pinazo, A.; Pérez, L.; Infante, M.R.; Pons, R. *Phys Chem Chem Phys* **2004**, *6*, 1475-1481), se logra mediante la variación de su balance carga-hidrofobicidad, ya sea por acetilación del grupo  $\alpha$ -amino o bien por la variación

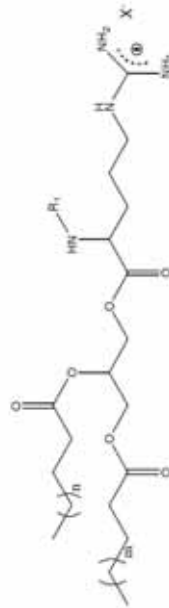
3

de la longitud de la cadena hidrofóbica, dando lugar a una amplia colección de análogos con diferentes comportamientos en sistemas biológicos. Las vesículas catiónicas han sido ampliamente utilizadas como promotores de reacciones químicas y enzimáticas y, más recientemente, como vehículo para facilitar la liberación de ADN o de otros fármacos de tamaño pequeño en células eucariotas (Bramer, T.; Dew, N.; Desmán, K. *J Pharm Pharmacol* **2007**, *59*, 1319-1334). Los tensioactivos iónicos utilizados en la preparación de las mezclas catiónicas pueden ser de una o múltiples cadenas. Mezclando tensioactivos de una cadena de carga opuesta da lugar a tensioactivos catiónicos de pseudo-doble-cadena (Kamenka, N.; Chorro, M.; Taimon, Y.; Zana, R.; *Colloids Surf* **1992**, *67*, 213-222). Sin embargo, la mayor parte de la literatura se centra en tensioactivos de simple-doble cadena, formando mezclas catiónicas de pseudo-triple cadena (Marques, E.F.; Brito, R.O.; Silva, S.G.; Rodríguez-Borges, J.E.; Vale, M.L.; Gomes, P.; Araújo, M.J.; Söderman, O. *Langmuir* **2008**, *24*, 11009-11017).

15

**DESCRIPCION DE LA INVENCION**

20 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende un compuesto de fórmula (I)



donde m y n son iguales o diferentes y tienen un valor entre 6 y 18

R<sub>1</sub> es -CO-R<sub>2</sub> o -H

R<sub>2</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>.

25

- 4
- X es un halogenuro o sus derivados o solvatos; y al menos un fosfolípido.
- 5 El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 3 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico o un grupo sustituido o no sustituido seleccionado de entre amino, amido, éster carboxílico, éter, tío, aclamino o carboxamido.
- 10 Preferiblemente, en la composición descrita anteriormente el fosfolípido es anfótero. Más preferiblemente dicho fosfolípido anfótero es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).
- 15 Preferiblemente, en la composición descrita anteriormente el fosfolípido es aniónico. Más preferiblemente dicho fosfolípido aniónico se selecciona entre L- $\alpha$ -fosfatidil-DL-glicerol (PG), diacilfosfatidilserina, diacilfosfatidilinositol o 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfato sal monosódica.
- 20 Las longitudes de cadena hidrófoba del fosfolípido utilizado en la presente invención pueden ser variables, y dado que se busca biocompatibilidad, los fosfolípidos más adecuados para realizar la presente invención serían los que se encuentran en productos naturales.
- 25 En una realización preferida, en la composición descrita anteriormente n es 8, 10 ó 12.
- 30 En otra realización preferida, en el compuesto de fórmula (I) R<sub>2</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>.
- 5
- En otra realización preferida, X es cloruro.
- 5 Debido a la naturaleza anfipática y estructura de los componentes de la composición de la presente invención, éstos tienden a formar vesículas por lo que una realización preferida de la presente invención es en la que dicha composición se presenta en forma de dispersión de vesículas o liposomas, siendo agentes dispersantes preferidos el agua pura o como componente mayoritario de soluciones (de carácter salino, taponente o orgánico).
- 10 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a la composición descrita para preparar un medicamento.
- En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de la composición descrita anteriormente para preparar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad causada por bacterias o protozoos.
- 15 La composición de la presente invención es una mezcla de lipoproteínas catiónicas con fosfolípidos de carga negativa, y el resultado de la mezcla de este tipo de compuestos es una composición con actividad antimicrobiana (tanto antibacteriana como antiprotzoaria) pero que a la vez disminuye la actividad hemolítica. La disminución de la hemotoxicidad consiguiendo mantener la efectividad antimicrobiana supone una ventaja respecto a otros compuestos de estructura similar con aplicaciones antibióticas.
- 20 En una realización preferida, la enfermedad está causada por una bacteria que se selecciona entre las de los géneros *Staphylococcus* o *Acinetobacter*. En una realización más preferida, la enfermedad está causada por una bacteria que se selecciona entre *Staphylococcus aureus* o *Acinetobacter baumannii*.
- 25 En otra realización preferida, la enfermedad está causada por un protozoo del género *Leishmania*. En una realización más preferida, la enfermedad está

- 6  
causada por un protozoo que se selecciona entre *Leishmania donovani* o *Leishmania pifanoi*.
- 7  
derivados o solvatos.
- 5  
Los compuestos de la presente invención de fórmula (I) pueden ser obtenidos o producidos mediante una vía sintética química u obtenidos a partir de una materia natural de distinto origen.
- 10  
En un último aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la composición descrita anteriormente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, dicha composición farmacéutica además comprende otro principio activo.
- 15  
Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.
- 20  
Los compuestos descritos en la presente invención, sus derivados o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o derivados o solvatos.
- 25  
En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por
- 6  
Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.
- 15  
Tal como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como derivados farmacéuticamente no aceptables ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del derivado farmacéuticamente aceptable no es crítica, siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable.
- 25  
Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus derivados o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus

8

esta invención se efectúa por vía oral, tóptica, rectal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa, etc.).

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenden en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

**DESCRIPCION DE LAS FIGURAS**

15 **Fig. 1.** Muestra la actividad leishmanicida de DPPC (□), DPPC/PG/1,4% tensioactivo (■) y tensioactivo (○) para los tensioactivos 1212Rac (a) y 1414Rac (b) en promastigotes *Leishmania donovani*.

20 **Fig. 2.** Muestra la actividad leishmanicida de DPPC/PG 7:3 (□), DPPC/PG/1,4% tensioactivo (■) y tensioactivo (○) para los tensioactivos 1212Rac (a) y 1414Rac (b) en promastigotes *Leishmania donovani*.

25 **Fig. 3.** Muestra la actividad leishmanicida de (a) PG/1212Rac y (b) PG/1414Rac, a fracciones molares de tensioactivo de 0 (□), 0.2 (■), 0.4 (▲), 0.6 (▼), 0.8 (●) y 1 (○) en promastigotes *Leishmania donovani*.

**Fig. 4.** Muestra la actividad leishmanicida de DPPC (□), DPPC/1,4% tensioactivo (■) y tensioactivo (○) para los tensioactivos 1212Rac (a) y 1414Rac (b) en amastigotes axénicos de *Leishmania pifanoi*.

9

**Fig. 5.** Muestra la actividad leishmanicida de DPPC/PG 7:3 (□), DPPC/PG/1,4% tensioactivo (■) y tensioactivo (○) para los tensioactivos 1212Rac (a) y 1414Rac (b) en amastigotes axénicos de *Leishmania pifanoi*.

5 **Fig. 6.** Muestra la actividad leishmanicida de (a) PG/1212Rac y (b) PG/1414Rac, a fracciones molares de tensioactivo de 0 (□), 0.2 (■), 0.4 (▲), 0.6 (▼), 0.8 (●) y 1 (○) en amastigotes axénicos de *Leishmania pifanoi*.

10 **Fig. 7.** Muestra la actividad antimicrobiana de DPPC/PG 7:3 (□), DPPC/PG/1,4% tensioactivo (■) y tensioactivo (○) para los tensioactivos 1212Rac (a) y 1414Rac (b) en *Staphylococcus aureus*.

15 **Fig. 8.** Muestra la actividad antimicrobiana de (a) PG/1212Rac y (b) PG/1414Rac, a fracciones molares de tensioactivo de 0 (□), 0.2 (■), 0.8 (●) y 1 (○) en *Staphylococcus aureus*.

20 **Fig. 9.** Muestra la actividad antimicrobiana de DPPC/PG 7:3 (□), DPPC/PG/1,4% tensioactivo (■) y tensioactivo (○) para los tensioactivos 1212Rac (a) y 1414Rac (b) en *Acinetobacter baumannii*.

**Fig. 10.** Muestra la actividad antimicrobiana de (a) PG/1212Rac y (b) PG/1414Rac, a fracciones molares de tensioactivo de 0 (□), 0.2 (■), 0.8 (●) y 1 (○) en *Acinetobacter baumannii*.

25 **Fig. 11.** Muestra la actividad hemolítica inducida por DPPC/PG 7:3 (□), DPPC/PG/1,4% tensioactivo (■) y tensioactivo (○) para los tensioactivos 1212Rac (a) y 1414Rac (b).

30 **Fig. 12.** Muestra la actividad hemolítica inducida por (a) PG/1212Rac y (b) PG/1414Rac, a fracciones molares de tensioactivo de 0 (□), 0.2 (■), 0.8 (●) y 1 (○).

fosfolipidos fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidicolina (PC) fueron suministrados por Sigma, con una pureza del 99% y utilizados tal y como se recibieron. El agua se obtuvo mediante Synergy® Water System (resistividad = 18.2 MΩ cm). El etanol de pureza HPLC fue suministrado por Panreac (agua ± 0.2%).

Previamente a cualquier manipulación, los tensioactivos y los fosfolípidos fueron esterilizados por solubilización en etanol y posterior evaporación en una campana en condiciones estériles. Las dispersiones madre (C<sub>1</sub> de 10 mM), ya sea del tensioactivo puro, de los fosfolípidos, o bien de las formulaciones fosfolípido-tensioactivo, a fracción molar de tensioactivo (X) de 0.2 y 0.8, fueron preparados por peso e hidratadas en agua. Todas las dispersiones fueron agitadas vigorosamente a temperatura ambiente durante 5 minutos y, a continuación, sonicadas a 50 °C durante 15 minutos para promover la formación de vesículas uniformes. Las concentraciones más bajas se obtuvieron por dilución de las dispersiones madre.

**2. Actividad leishmanicida**

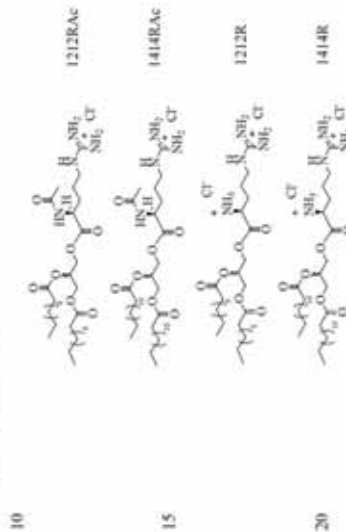
La actividad letal de tensioactivo sobre parásitos de leishmania (promastigotes, amastigotes) fue evaluada por la disminución de la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Las mitocondrias de los parásitos son capaces de reducir el MTT, formando formazán (característico por su color negro), pudiéndose así cuantificar la actividad de los tensioactivos mediante medidas de absorbancia a λ=595 nm.

Al formular los tensioactivos monocatiónicos con el fosfolípido DPPC, se obtuvieron los resultados representados en la Fig. 1. En esta formulación, debido al carácter anfótero del fosfolípido, el hecho de formular el tensioactivo catiónico no modifica la carga total neta del sistema. En el caso del 1212RAC (Fig. 1a), la formulación del tensioactivo no incrementa la actividad leishmanicida en comparación a la actividad del tensioactivo puro dentro del rango de concentraciones estudiadas de 0-400 µM. Es necesario destacar que

**EJEMPLOS**

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de la composición descrita en la presente invención.

En los siguientes ejemplos se han empleado como tensioactivos los compuestos denominados 1212R, 1212RAC, 1414R y 1414RAC que tienen las siguientes fórmulas:



**1. Materiales y métodos**

Los tensioactivos diacylglicerol monocatiónicos (1212RAC, 691.4 g / mol, 1414RAC, 747.5 g / mol) y dicatiónicos (1212R, 685.8 g / mol, 1414R, 741.9 g / mol) derivados del amino ácido arginina fueron sintetizados siguiendo la metodología descrita por Pérez, L. (Pérez, L.; Infante, M.R.; Angelet, M.; Clapes, P.; Pinazo, A. *Prog Colloid Polym Sci* **2004**, *123*, 210-216; Pérez, L.; Infante, M.R.; Pons, R.; Moran, M.C.; Vinardell, P.; Mitjans, M.; Pinazo, A. *Colloids Surf B* **2004**, *35*, 235-242). Su pureza, superior al 99%, fue determinado mediante las técnicas de HPLC, RMN y análisis elemental. Los

12

la concentración representada corresponde a la concentración total del sistema, por lo tanto, a una concentración total de 200µM, una concentración de tensioactivo del 1.4% corresponde a 2.8µM. La adición de esta pequeña cantidad de tensioactivo, hace incrementar la actividad al 17%, mientras que el tensioactivo por sí solo, a 2.8µM, no presenta actividad alguna.

5

La formulación de los tensioactivos con la mezcla de dos fosfolípidos DPPC/PG 7:3 (w/w) tiene como finalidad conseguir modificar la carga neta total del sistema ya que el fosfolípido PG presenta carácter aniónico. Se puede observar que tanto para el 1212RAC (Fig. 2a) como para el 1414RAC

10

(Fig. 2b), la adición de una pequeña cantidad de tensioactivo (1.4%) no es suficiente como para aumentar la actividad leishmanicida del fosfolípido, sino todo lo contrario, ya que es capaz de reducir la actividad del 23% a prácticamente hacerlo inactivo.

15

En la Fig. 3 se representa la actividad leishmanicida del sistema PG:tensioactivo a diferentes fracciones molares de tensioactivo. Se observa que la carga neta total del sistema no marca ninguna tendencia en la actividad leishmanicida en promastigotes *L. donovani*. La actividad observada es similar para todas las fracciones estudiadas.

20

En el sistema DPPC/1.4% tensioactivo (Fig. 4), la adición de esta pequeña cantidad de tensioactivo no provoca un aumento de la actividad leishmanicida cuando se trata del tensioactivo 1212RAC (Fig. 4a), mientras que para el 1414RAC (Fig. 4b) sí que aumenta progresivamente en función de la concentración, llegando a valores de actividad del 10% a una concentración total de 400µM.

25

En la Fig. 5 se han representado las actividades leishmanicidas frente a los amastigotes de los sistemas formulados con la mezcla de fosfolípidos DPPC/PG 7:3 (w/w). Para ambos tensioactivos, las actividades de los sistemas formulados experimentan un comportamiento similar al DPPC:tensioactivo.

30

13

Se ha estudiado el efecto de la carga neta del sistema PG:tensioactivo respecto a la actividad frente a los amastigotes en función de la concentración total (Fig. 6). Ambos tensioactivos presentan una actividad leishmanicida del 30% a 400 µM, a fracciones molares de tensioactivo de 0.8 y 0.6. Estos resultados experimentales confirman que la actividad frente a amastigotes *L. pifanoi aréncic* no depende de la longitud de cadena hidrocarbonada, pero sí de cuanto a la actividad leishmanicida.

5

### 3. Actividad antibacteriana.

10

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron bacterias Gram-negativas *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 y Gram-positivas *Staphylococcus aureus* CECT 240. La actividad antimicrobiana de los tensioactivos se probó en placas de 96 pocillos por inhibición del crecimiento bacteriano en caldo Mueller-Hinton (Oxoid) a 37 °C durante 18 h con un inóculo inicial de  $N_{0.05}=0.005$  (Saugar, J.M.; Rodríguez-Hernández, M.J.; de la Torre, B.G.; Pachon-Ibanez, M.E.; Fernández-Reyes, M.; Andreu, D.; Pachon, J.; Rivas, L. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, 50:1251-1256). Los tensioactivos fueron ensayados en un rango de concentraciones de 0-250 µM.

20

En la Fig. 7 se puede observar que la actividad antimicrobiana de los tensioactivos puros 1212RAC y 1414RAC es del 20%, siendo ligeramente superior para el 1414RAC como sucedía en las actividades leishmanicidas tanto en promastigotes como en amastigotes. Al adicionar un 1.4% de tensioactivo a la mezcla de fosfolípidos DPPC/PG 7:3, el comportamiento es sorprendente ya que las actividades conseguidas (35%) son superiores a las que presentan los propios tensioactivos (20%). Para ambos sistemas formulados (Fig. 7a, b), existe un máximo de efecto bactericida a 100µM que corresponde a una actividad aproximada del 45%. Al aumentar la concentración total del sistema, la actividad se ve reducida en un 7%, probablemente debido a la aparición de precipitado. Se puede observar que

30

14	<p>prácticamente no existen diferencias en las actividades en función de la longitud de cadena hidrocarbonada, mientras que, aparentemente, la carga negativa del sistema formulado está favorecida con respecto a la carga positiva del tensioactivo.</p> <p>En la Fig. 8 se ha representado el efecto bactericida de los sistemas PG/tensioactivo a diferentes fracciones molares de tensioactivo. De la misma manera que en caso anteriormente descrito, la presencia de carga neta negativa en el sistema favorece la actividad antimicrobiana en las bacterias gram positivas <i>Staphylococcus aureus</i>. A una concentración total de 50µM, el efecto bactericida a la fracción molar de tensioactivo de 0.2 es máximo para los dos formulados: un 59% para el caso del 1212RAC y un 55% para el 1414RAC. En ambos casos, existe también una pérdida del efecto bactericida de un 7% al aumentar la concentración hasta 300µM. A la fracción molar de tensioactivo de 0.8 donde la carga neta es positiva, el efecto bactericida es prácticamente nulo.</p> <p>Una vez analizado el efecto bactericida en gram positivos (<i>Staphylococcus aureus</i>), a continuación se procedió a estudiar el efecto de formular los tensioactivos frente a las bacterias gram negativas (<i>Acinetobacter baumannii</i>).</p> <p>En la Fig. 9 se ha representado la actividad antimicrobiana del sistema DPPC/PG/tensioactivo. Si nos centramos en el comportamiento de los tensioactivos puros 1212RAC (Fig. 9a) y 1414RAC (Fig. 9b), se puede observar una gran actividad antimicrobiana, alcanzando valores estables del 67 y del 70%. a 300µM. En el momento de formularlos con la mezcla de fosfolípidos DPPC/PG 7:3, las actividades caen a valores cercanos al 0%. Este hecho implica que en este tipo de bacterias, la carga positiva es imprescindible para el efecto bactericida.</p> <p>En la Fig. 10 se ha representado el efecto bactericida en función de la concentración total para el sistema PG/tensioactivo. Al igual que sucedía en el sistema descrito anteriormente, la presencia de carga positiva en las fracciones molares de tensioactivo de 0.8 y 1, es la causante de la actividad</p>	5
15	<p>antimicrobiana frente a las bacterias gram negativas <i>Acinetobacter baumannii</i>, mientras que para fracciones molares de tensioactivo de 0.2 y 0, la actividad antimicrobiana es nula. A fracciones molares de tensioactivo de 0.8 y 1, se tiene que destacar el máximo efecto bactericida a 50µM, del 61% para el sistema PG/1212RAC y del 50% para PG/1414RAC. Al aumentar la concentración total de los dos sistemas, la actividad se ve reducida un 20 y un 25% respectivamente, probablemente debido a la presencia de precipitado en el sistema.</p> <p><b>4. Reducción de la actividad hemolítica</b></p> <p>Para evaluar la citotoxicidad, se ensayó la actividad hemolítica de los tensioactivos, tal y como se describe a continuación. En resumen, los eritrocitos de oveja de sangre desfibrinada por Biomedix (Madrid, España) fueron lavados y resuspendidos en el medio Hanks e incubados (<math>20 \times 10^6</math> células/mL) con los diferentes preparados en el rango de concentraciones comprendido entre 0 y 400 µM durante 4 horas a 37 °C. Posteriormente, las células fueron centrifugadas, y el sobrenadante que contiene la hemoglobina liberada, fue recogido y transferido en una placa de 96 pocillos y medida en un lector de microplacas Bio-Rad a 550 nm. Se considera hemólisis completa la obtenida con 0,1% Triton X-100.</p> <p>La estrategia utilizada para reducir el poder hemolítico de los tensioactivos catiónicos se basa en la formulación de los tensioactivos con fosfolípidos de carga negativa, de tal manera que la carga positiva de los tensioactivos se vea neutralizada. La carga neta de la formulación mixta dependerá de la proporción de tensioactivo/fosfolípido. El formulado DPPC/tensioactivo no se ha estudiado experimentalmente en este apartado debido al carácter anfipático del fosfolípido DPPC. La actividad hemolítica del formulado DPPC/PG/1,4% tensioactivo se ha representado en la Fig. 11. La carga neta negativa del sistema mixto es suficiente como para reducir la hemólisis del tensioactivo 1212RAC y 1414RAC de aproximadamente 100% a valores de 18 y del 6%, respectivamente.</p>	5 10
15	<p>antimicrobiana frente a las bacterias gram negativas <i>Acinetobacter baumannii</i>, mientras que para fracciones molares de tensioactivo de 0.2 y 0, la actividad antimicrobiana es nula. A fracciones molares de tensioactivo de 0.8 y 1, se tiene que destacar el máximo efecto bactericida a 50µM, del 61% para el sistema PG/1212RAC y del 50% para PG/1414RAC. Al aumentar la concentración total de los dos sistemas, la actividad se ve reducida un 20 y un 25% respectivamente, probablemente debido a la presencia de precipitado en el sistema.</p> <p><b>4. Reducción de la actividad hemolítica</b></p> <p>Para evaluar la citotoxicidad, se ensayó la actividad hemolítica de los tensioactivos, tal y como se describe a continuación. En resumen, los eritrocitos de oveja de sangre desfibrinada por Biomedix (Madrid, España) fueron lavados y resuspendidos en el medio Hanks e incubados (<math>20 \times 10^6</math> células/mL) con los diferentes preparados en el rango de concentraciones comprendido entre 0 y 400 µM durante 4 horas a 37 °C. Posteriormente, las células fueron centrifugadas, y el sobrenadante que contiene la hemoglobina liberada, fue recogido y transferido en una placa de 96 pocillos y medida en un lector de microplacas Bio-Rad a 550 nm. Se considera hemólisis completa la obtenida con 0,1% Triton X-100.</p> <p>La estrategia utilizada para reducir el poder hemolítico de los tensioactivos catiónicos se basa en la formulación de los tensioactivos con fosfolípidos de carga negativa, de tal manera que la carga positiva de los tensioactivos se vea neutralizada. La carga neta de la formulación mixta dependerá de la proporción de tensioactivo/fosfolípido. El formulado DPPC/tensioactivo no se ha estudiado experimentalmente en este apartado debido al carácter anfipático del fosfolípido DPPC. La actividad hemolítica del formulado DPPC/PG/1,4% tensioactivo se ha representado en la Fig. 11. La carga neta negativa del sistema mixto es suficiente como para reducir la hemólisis del tensioactivo 1212RAC y 1414RAC de aproximadamente 100% a valores de 18 y del 6%, respectivamente.</p>	5 10 15
15	<p>antimicrobiana frente a las bacterias gram negativas <i>Acinetobacter baumannii</i>, mientras que para fracciones molares de tensioactivo de 0.2 y 0, la actividad antimicrobiana es nula. A fracciones molares de tensioactivo de 0.8 y 1, se tiene que destacar el máximo efecto bactericida a 50µM, del 61% para el sistema PG/1212RAC y del 50% para PG/1414RAC. Al aumentar la concentración total de los dos sistemas, la actividad se ve reducida un 20 y un 25% respectivamente, probablemente debido a la presencia de precipitado en el sistema.</p> <p><b>4. Reducción de la actividad hemolítica</b></p> <p>Para evaluar la citotoxicidad, se ensayó la actividad hemolítica de los tensioactivos, tal y como se describe a continuación. En resumen, los eritrocitos de oveja de sangre desfibrinada por Biomedix (Madrid, España) fueron lavados y resuspendidos en el medio Hanks e incubados (<math>20 \times 10^6</math> células/mL) con los diferentes preparados en el rango de concentraciones comprendido entre 0 y 400 µM durante 4 horas a 37 °C. Posteriormente, las células fueron centrifugadas, y el sobrenadante que contiene la hemoglobina liberada, fue recogido y transferido en una placa de 96 pocillos y medida en un lector de microplacas Bio-Rad a 550 nm. Se considera hemólisis completa la obtenida con 0,1% Triton X-100.</p> <p>La estrategia utilizada para reducir el poder hemolítico de los tensioactivos catiónicos se basa en la formulación de los tensioactivos con fosfolípidos de carga negativa, de tal manera que la carga positiva de los tensioactivos se vea neutralizada. La carga neta de la formulación mixta dependerá de la proporción de tensioactivo/fosfolípido. El formulado DPPC/tensioactivo no se ha estudiado experimentalmente en este apartado debido al carácter anfipático del fosfolípido DPPC. La actividad hemolítica del formulado DPPC/PG/1,4% tensioactivo se ha representado en la Fig. 11. La carga neta negativa del sistema mixto es suficiente como para reducir la hemólisis del tensioactivo 1212RAC y 1414RAC de aproximadamente 100% a valores de 18 y del 6%, respectivamente.</p>	5 10 15 20
15	<p>antimicrobiana frente a las bacterias gram negativas <i>Acinetobacter baumannii</i>, mientras que para fracciones molares de tensioactivo de 0.2 y 0, la actividad antimicrobiana es nula. A fracciones molares de tensioactivo de 0.8 y 1, se tiene que destacar el máximo efecto bactericida a 50µM, del 61% para el sistema PG/1212RAC y del 50% para PG/1414RAC. Al aumentar la concentración total de los dos sistemas, la actividad se ve reducida un 20 y un 25% respectivamente, probablemente debido a la presencia de precipitado en el sistema.</p> <p><b>4. Reducción de la actividad hemolítica</b></p> <p>Para evaluar la citotoxicidad, se ensayó la actividad hemolítica de los tensioactivos, tal y como se describe a continuación. En resumen, los eritrocitos de oveja de sangre desfibrinada por Biomedix (Madrid, España) fueron lavados y resuspendidos en el medio Hanks e incubados (<math>20 \times 10^6</math> células/mL) con los diferentes preparados en el rango de concentraciones comprendido entre 0 y 400 µM durante 4 horas a 37 °C. Posteriormente, las células fueron centrifugadas, y el sobrenadante que contiene la hemoglobina liberada, fue recogido y transferido en una placa de 96 pocillos y medida en un lector de microplacas Bio-Rad a 550 nm. Se considera hemólisis completa la obtenida con 0,1% Triton X-100.</p> <p>La estrategia utilizada para reducir el poder hemolítico de los tensioactivos catiónicos se basa en la formulación de los tensioactivos con fosfolípidos de carga negativa, de tal manera que la carga positiva de los tensioactivos se vea neutralizada. La carga neta de la formulación mixta dependerá de la proporción de tensioactivo/fosfolípido. El formulado DPPC/tensioactivo no se ha estudiado experimentalmente en este apartado debido al carácter anfipático del fosfolípido DPPC. La actividad hemolítica del formulado DPPC/PG/1,4% tensioactivo se ha representado en la Fig. 11. La carga neta negativa del sistema mixto es suficiente como para reducir la hemólisis del tensioactivo 1212RAC y 1414RAC de aproximadamente 100% a valores de 18 y del 6%, respectivamente.</p>	5 10 15 20 25
15	<p>antimicrobiana frente a las bacterias gram negativas <i>Acinetobacter baumannii</i>, mientras que para fracciones molares de tensioactivo de 0.2 y 0, la actividad antimicrobiana es nula. A fracciones molares de tensioactivo de 0.8 y 1, se tiene que destacar el máximo efecto bactericida a 50µM, del 61% para el sistema PG/1212RAC y del 50% para PG/1414RAC. Al aumentar la concentración total de los dos sistemas, la actividad se ve reducida un 20 y un 25% respectivamente, probablemente debido a la presencia de precipitado en el sistema.</p> <p><b>4. Reducción de la actividad hemolítica</b></p> <p>Para evaluar la citotoxicidad, se ensayó la actividad hemolítica de los tensioactivos, tal y como se describe a continuación. En resumen, los eritrocitos de oveja de sangre desfibrinada por Biomedix (Madrid, España) fueron lavados y resuspendidos en el medio Hanks e incubados (<math>20 \times 10^6</math> células/mL) con los diferentes preparados en el rango de concentraciones comprendido entre 0 y 400 µM durante 4 horas a 37 °C. Posteriormente, las células fueron centrifugadas, y el sobrenadante que contiene la hemoglobina liberada, fue recogido y transferido en una placa de 96 pocillos y medida en un lector de microplacas Bio-Rad a 550 nm. Se considera hemólisis completa la obtenida con 0,1% Triton X-100.</p> <p>La estrategia utilizada para reducir el poder hemolítico de los tensioactivos catiónicos se basa en la formulación de los tensioactivos con fosfolípidos de carga negativa, de tal manera que la carga positiva de los tensioactivos se vea neutralizada. La carga neta de la formulación mixta dependerá de la proporción de tensioactivo/fosfolípido. El formulado DPPC/tensioactivo no se ha estudiado experimentalmente en este apartado debido al carácter anfipático del fosfolípido DPPC. La actividad hemolítica del formulado DPPC/PG/1,4% tensioactivo se ha representado en la Fig. 11. La carga neta negativa del sistema mixto es suficiente como para reducir la hemólisis del tensioactivo 1212RAC y 1414RAC de aproximadamente 100% a valores de 18 y del 6%, respectivamente.</p>	5 10 15 20 25 30



Del mismo modo, el hecho de formular los tensioactivos catiónicos con PG provoca una reducción significativa de la actividad hemolítica, en función de la carga total del sistema. Tanto en la Fig. 12a como la 12b, a fracciones molares de tensioactivo de 0.2, las actividades hemolíticas se han visto reducidas considerablemente a valores del 0.1 y del 10%, respectivamente. Se ha constatado que la incorporación una pequeña cantidad de fosfolípido al tensioactivo reduce la hemólisis aproximadamente un 20% respecto a la del tensioactivo puro.



### REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un compuesto de fórmula (I)

5

donde m y n son iguales o diferentes y tienen un valor entre 6 y 18

R<sub>1</sub> es -CO-R<sub>2</sub> o -H,

R<sub>2</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>,

X es un halógeno

o sus derivados o solvatos;

y al menos un fosfolípido.

10

2. Composición según la reivindicación 1 donde el fosfolípido es anfótero.

- 15 3. Composición según la reivindicación 2 donde el fosfolípido anfótero es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)

4. Composición según la reivindicación 1 donde el fosfolípido es aniónico.

- 20 5. Composición según la reivindicación 4 donde el fosfolípido aniónico se selecciona entre L- $\alpha$ -fosfatidil-DL-glicerol (PG), diacilfosfatidilserina, diacilfosfatidilinositol o 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfato sal monosódica.

6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde n y m

- 25 son iguales y tienen un valor que se selecciona entre 8, 10, 12, 14 ó 16.

- 18
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde R<sub>2</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde X es cloruro.
9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que se encuentra en forma de dispersión de vesículas.
10. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para preparar un medicamento.
11. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para preparar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad causada por bacterias o protozoos.
12. Uso según la reivindicación 11 donde la enfermedad esta causada por una bacteria que se selecciona entre las de los géneros *Staphylococcus* o *Acinetobacter*.
13. Uso según la reivindicación 12 donde la enfermedad esta causada por una bacteria que se selecciona entre *Staphylococcus aureus* o *Acinetobacter baumannii*.
14. Uso según la reivindicación 11 donde la enfermedad esta causada por un protozoo del género *Leishmania*.
15. Uso según la reivindicación 14 donde la enfermedad esta causada por un protozoo que se selecciona entre *Leishmania donovani* o *Leishmania pifanoi*.
- 19
16. Composición farmacéutica que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 junto a un vehículo farmacéuticamente aceptable.
17. Composición farmacéutica según la reivindicación 16 que además comprende otro principio activo.

21

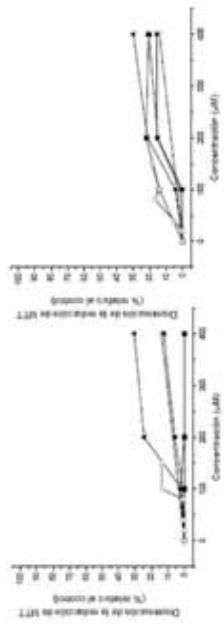


FIG. 3

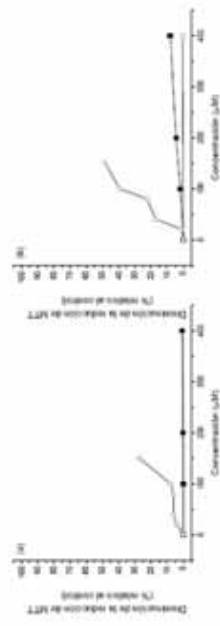


FIG. 4

20

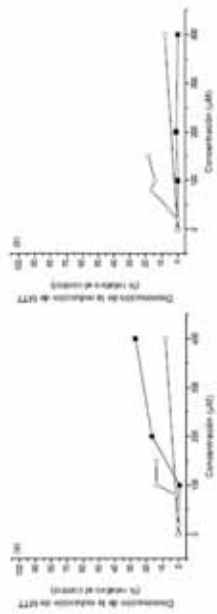


FIG. 1

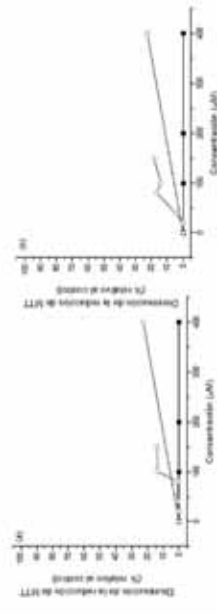


FIG. 2

23

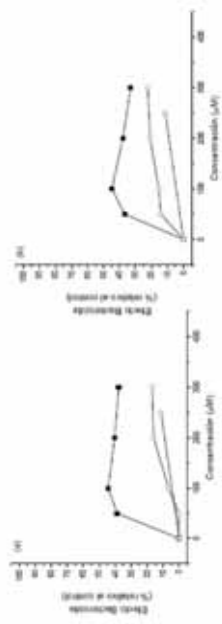


FIG. 7

22

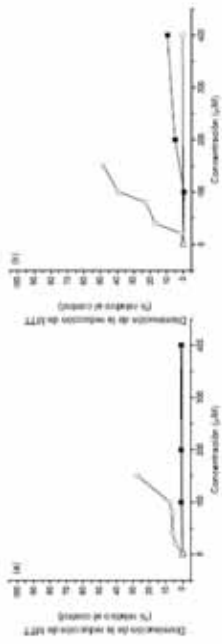


FIG. 5

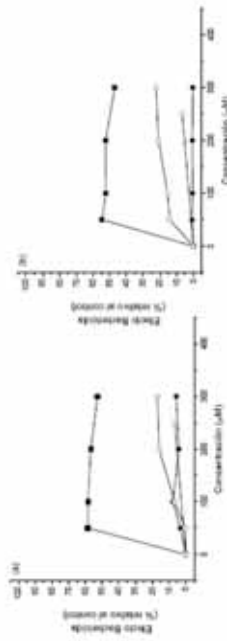


FIG. 8

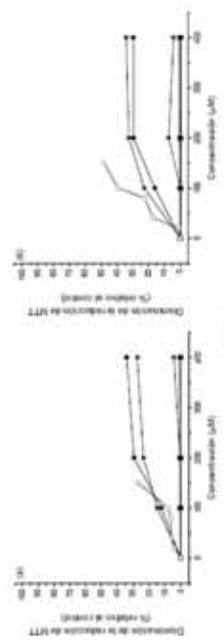


FIG. 6

25

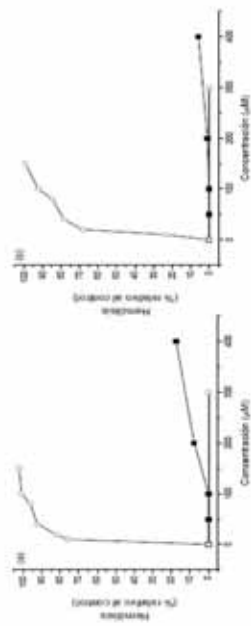


FIG. 11

24

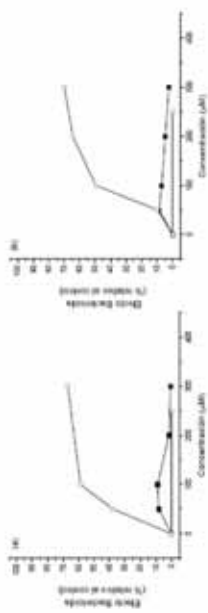


FIG. 9

FIG. 12

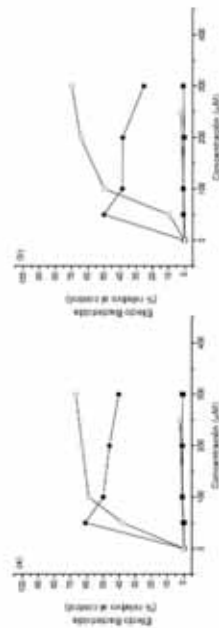
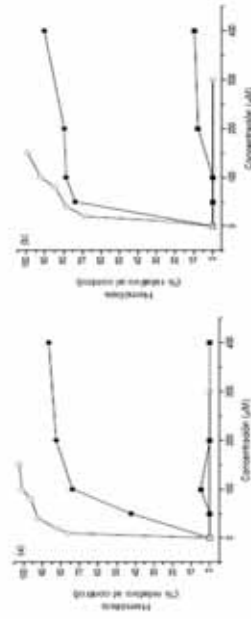


FIG. 10

**RESUMEN**

La presente invención se refiere a una composición formada por un tensioactivo catiónico que es un diacilglicerol derivado de arginina y al menos un fosfolípidos. La estructura de esta composición confiere propiedades antibacterianas y antileishmanicas, con un menor poder hemolítico, por lo que son adecuadas para su uso para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias y protozoos.



*Apèndix II - Sol·licitud de patent ES1641.261BIS*



**Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente**

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P200931165	
Fecha de recepción:	15 diciembre 2009, 11:40 (CET)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1641.261BIS	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes:	1	
Pais:	ES	
Título:	USO DE ACILGLICEROLES DERIVADOS DE ARGININA COMO ANTIPROTOZOARIOS	
Documentos enviados:	Descripción-1.pdf (10 p.) Reivindicaciones-1.pdf (2 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) Dibujos-1.pdf (3 p.) FEERCPT-1.pdf (1 p.)	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS CONSULTORES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL SA - CIF A28750891 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50534279J,OU=703015345,OU=fnmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	15 diciembre 2009, 11:40 (CET)	
Codificación del envío:	3E:45:F1:23:15:2C:47:73:3D:02:AC:D4:6D:FF:98:20:19:AD:E9:1A	

/Madrid, Oficina Receptora/





(1) MODALIDAD:	<b>PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
(4) LUGAR DE PRESENTACION: LUGAR		OEPM, Presentación Electrónica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACIÓN SOCIAL:  NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI-CIF-PASAPORTE: CNAE: PYME:  DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO:  MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)  España ES Q2818002D  C/ SERRANO, 117 MADRID 28 Madrid 28006 España ES  <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI-PASAPORTE:	PONS PONS RAMON España ES
(6-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI-PASAPORTE:	PINAZO GASSOL AURORA España ES
(6-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI-PASAPORTE:	LOZANO VALDÉS NEUS España ES
(6-4) INVENTOR 4:	APELLIDOS:	RIVAS LÓPEZ

(6-5) INVENTOR 5:	NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI PASAPORTE:	LUIS IGNACIO España ES
(6-6) INVENTOR 6:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI PASAPORTE:	FERNÁNDEZ-REYES SILVESTRE MARÍA DEL ROSARIO España ES
(6-7) INVENTOR 7:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI PASAPORTE:	LUQUE ORTEGA JUAN ROMÁN España ES
(6-8) INVENTOR 8:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI PASAPORTE:	PÉREZ MUÑOZ LOURDES España ES
(6-9) INVENTOR 9:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI PASAPORTE:	INFANTE MARTINEZ-PARDO MARIA ROSA España ES
(7) TÍTULO DE LA INVENCION:		USO DE ACILGLICEROLES DERIVADOS DE ARGININA COMO ANTIPROTOZOARIOS
(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(9) SOLICITA LA INCLUSION EN EL PROCEDIMIENTO ACCELERADO DE CONCESION	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(11) DEPÓSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	
(12) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:	LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS	<input type="checkbox"/>
(13) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:	
(14) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	

<p>(15) AGENTE/REPRESENTANTE:</p>	<p>APELLIDOS: PONS ARIÑO          NOMBRE: ANGEL           NACIONALIDAD: España          CÓDIGO PAÍS: ES          DNI/CIF/PASAPORTE: 50534279-J           DOMICILIO: GLORIETA DE RUBÉN          DARIO, 4          LOCALIDAD: MADRID          PROVINCIA: 28 Madrid          CÓDIGO POSTAL: 28010          PAÍS RESIDENCIA: España          CÓDIGO PAÍS: ES          TELÉFONO:          FAX:          CORREO ELECTRÓNICO:           NÚMERO DE PODER: 20081765</p>
<p>(16) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:</p>	<p>DESCRIPCIÓN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 10          REIVINDICACIONES: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 9          DIBUJOS: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 5          RESUMEN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1          FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: <input type="checkbox"/> N.º de figura(s):          ARCHIVO DE PRECONVERSION: <input type="checkbox"/>          DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:          JUSTIFICANTE DE PAGO (1): <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1          LISTA DE SECUENCIAS PDF: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:          ARCHIVO PARA LA BÚSQUEDA DE LS: <input type="checkbox"/>          OTROS (Aparecerán detallados):</p>
<p>(17) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:</p>	<p><input type="checkbox"/>           DOC COPIA DNI: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:          DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:          DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:          DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:          DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:          DOC COPIA OTROS: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:</p>
<p>(18) NOTAS:</p>	
<p>(19) FIRMA DIGITAL:</p>	<p>FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE: ENTIDAD PONS          CONSULTORES DE          PROPIEDAD INDUSTRIAL          SA - CIF A28750891 -          NOMBRE PONS ARIÑO          ANGEL - NIF 50534279J          Madrid          LUGAR DE FIRMA:          FECHA DE FIRMA: 15 Diciembre 2009</p>

1

**USO DE ACILGLICEROLIOS DERIVADOS DE ARGININA COMO ANTIPROTOZOARIOS**

5 La presente invención se refiere al uso de un grupo de acilglicerolios derivados de arginina con propiedades tensioactivas que poseen actividad antiparasitaria, más específicamente contra protozoos del género *Leishmania* y *Trypanosoma*.

10 **ESTADO DE LA TECNICA ANTERIOR**

Los diacilglicerolios derivados de arginina se sintetizaron con el objetivo de mejorar y abaratar los tensioactivos antimicrobianos existentes. Su uso en alimentos y aplicaciones cosméticas, así como desinfectantes tópicos, han sido estudiados ampliamente (Vinaró, M.P.; Benavides, T.; Mijangos, M.; Infante, M.R.; Clapes, P.; Clothier, R. *Food Chem Toxicol* 2008, 46, 3837-3841). La estructura de estos compuestos consiste en un esqueleto central formado por el glicerol, una parte hidrofóbica formada por ácidos alifáticos unidos al glicerol en las posiciones 1 y 2 mediante enlaces éster y una parte de carácter polar formada por un residuo de arginina unido al glicerol en la posición 3 mediante un enlace éster (Pérez, L.; Infante, M.R.; Angelet, M.; Clapes, P.; Pinazo, A. *Prog Colloid Polym Sci* 2004, 123, 210-216; Pérez, L.; Infante, M.R.; Pons, R.; Moran, M.C.; Vinaró, M.; Mijangos, M.; Pinazo, A. *Colloids Surf B* 2004, 35, 235-242). Estructuralmente se pueden considerar análogos de fosfolípidos con una funcionalidad mixta entre los lípidoácidos y triglicéridos. Además, la inclusión de un aminoácido favorece su biodegradabilidad. La modulación de sus propiedades físico-químicas, y por tanto de sus actividades biológicas asociadas, (Pinazo, A.; Pérez, L.; Infante, M.R.; Pons, R. *Phys Chem Chem Phys* 2004, 6, 1475-1481), se logra mediante la variación de su balance carga-hidrofobicidad, ya sea por acilación del grupo  $\alpha$ -amino o bien por la variación de la longitud de la cadena hidrofóbica, dando lugar a una amplia colección de análogos con diferentes comportamientos en sistemas biológicos.

2

La leishmaniasis humana es una enfermedad con distribución mundial, cuya incidencia se estima en unos 12 millones de casos. Aparece sobre todo en las áreas tropicales y subtropicales, aunque se encuentra también en los países europeos del Mediterráneo. Los parásitos del género *Leishmania*, producen diferentes formas de la enfermedad que van desde la leishmaniasis cutánea (LC), más leve, a la leishmaniasis visceral (LV), una forma mucho más grave de la enfermedad que afecta al sistema mononuclear fagocítico y resulta mortal si no se trata adecuadamente.

10 Las composiciones terapéuticas para tratar la leishmaniasis actualmente incluyen los derivados antimoniales pentavalentes (estibogluconato sódico y antimoniato de meglumina), el antibiótico anfotericina B y su formulación liposomal AmBisome®, el antibiótico paromomicina, el derivado de alquilfosfolipina miltefosina, la 8-aminoquinolina sitamaquina y la diamidina pentamidina (Mishra, J. et al. *Curr. Med. Chem.* 2007, 14, 1153-69). Sin embargo, estos fármacos presentan varias limitaciones como son su toxicidad, su difícil administración, el alto precio y, lo más preocupante, la aparición de cepas resistentes a los antimoniales (Croft, S. L. et al. *Clin Microbiol Rev* 2006, 19, 111-26). Además, el tratamiento de las formas más complejas de la enfermedad como en los casos de co-infección con VIH es poco efectivo. Otros compuestos estudiados en ensayos clínicos como posibles tratamientos contra *Leishmania* son: los azoles fungicidas (Berman, J. D. et al. *Mol Biochem Parasitol* 1986, 20, 85-92), los análogos de purinas, las aminoquinolinas, los alquilfosfolípidos (Croft, S. L. et al. *J Antimicrob Chemother* 1996, 38, 1041-7), los derivados de productos naturales quinónicos (E), lipochol, alcaloides, fenólicos (chalconas, flavonoides), y terpenicos (Mishra, J.; et al. *Curr Med Chem* 2007, 14, 1153-69).

4

En una realització preferida el protozo es del gènere *Leishmania* de la família *Trypanosomatidae*, y en una realització aún més preferida, protozo se selecciona entre las especies *Leishmania donovani*, *Leishmania pifanoi*, y que puede extenderse a otras especies del gènere, como ejemplo representativo pero no limitante a *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. colombiense*, *L. braziliensis*, *L. pifanoi*, *L. ethiopica*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. arabica* y que debido a las características del mecanismo de acción leishmanicida y a la similitud en la estructura de membrana plasmática, puede extenderse a otros miembros de la familia *Trypanosomatidae*, a la que pertenece *Leishmania*, como *Trypanosoma cruzi*, agente causante del mal de Chagas en América, o *Trypanosoma brucei rhodesiense* o *T.b.gambiense*, responsables de la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño.

5

En otra realización preferida, en el compuesto de fórmula (I) n y m son iguales y tienen un valor que se selecciona entre 8, 10, 12, 14 ó 16.

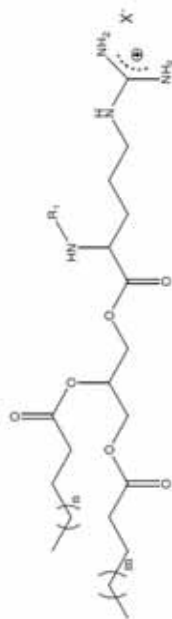
En otra realización preferida, en el compuesto de fórmula (I) R<sub>2</sub> es alquilo C<sub>1-7</sub>.

En otra realización preferida, en el compuesto de fórmula (I) X es cloruro.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término "solvato", tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I)



Fórmula (I)

donde m y n son iguales o diferentes y tienen un valor entre 6 y 18

R<sub>1</sub> es -CO-R<sub>2</sub> o -H

R<sub>2</sub> es alquilo C<sub>1-7</sub>

X es un halógeno

o sus derivados o solvatos,

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infecciones causadas por protozoos.

El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 3 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico o un grupo sustituido o no sustituido seleccionado de entre amino, amido, éster carboxílico, éter, ídol, aclamino o carboxamido.

El término "halógeno" se refiere a fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro.

5

Tal como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como derivados farmacéuticamente no aceptables ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del derivado farmacéuticamente aceptable no es crítica, siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable.

10 Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus derivados o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus derivados o solvatos.

20 Los compuestos de la presente invención de fórmula (I) pueden ser obtenidos o producidos mediante una vía sintética química u obtenidos a partir de una materia natural de distinto origen.

25 Los organismos de especies de *Trypanosoma* pertenecen al Superreino Eukaryota, Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae, Género *Trypanosoma*

30 Los organismos de especies de *Leishmania* pertenecen al Superreino Eukaryota, Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae, Género *Leishmania*

En otra realización preferida, el medicamento comprende otro principio activo.

6

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

**DESCRIPCION DE LAS FIGURAS**

10 **Fig. 1.** Actividad leishmanicida de los tensioactivos 1212RAC y 1212R (A) y de los tensioactivos 1414RAC y 1414R (B) en promastigotes *L. donovani*. Los datos de inhibición de la viabilidad de promastigotes se representan con triángulos y la inhibición de la proliferación como círculos.

20 **Fig. 2.** Actividad leishmanicida de los tensioactivos 1212RAC y 1212R (A) y de los tensioactivos 1414RAC y 1414R (B) en amastigotes axénicos de *L. pifanoi*. Los datos de inhibición de la viabilidad de promastigotes se representan con triángulos y la inhibición de la proliferación como círculos.

**Fig. 3.** Actividad hemolítica de los tensioactivos 1212RAC y 1212R y de los tensioactivos 1414RAC y 1414R en eritrocitos de oveja.

25 **Fig. 4.** Actividad leishmanicida en medio completo de crecimiento *RPMI 1640+ 10% suero fetal bovino inactivado* de los tensioactivos 1212RAC (círculo negro) y 1414RAC (círculo blanco) en promastigotes *L. donovani* (panel A) y amastigotes axénicos de *L. pifanoi* (panel B)

30 **Fig. 5.** Actividad leishmanicida de preparaciones de a) PG1212RAC y b) 1414RAC, a fracciones molares de tensioactivo de 0 (□), 0,2 (■), 0,4 (▲), 0,6 (▼), 0,8 (●), 1,0 (○) en promastigotes *L. donovani*. Los parásitos son

7	incubados en medio definido con la correspondiente forma vesicular durante 4h y los parásitos son posteriormente transferidos a su medio de crecimiento respectivo donde se permite su proliferación.	8	considerablemente, siendo necesaria una concentración superior a 200µM para llegar a una disminución de la reducción de MTT del 50% (ver Fig. 2, panel B).
5	<b>EJEMPLOS</b>	5	<b>2. Actividad hemolítica.</b>
10	<b>1. Actividad leishmanicida</b>	10	Una vez conocida la actividad leishmanicida de los tensioactivos catiónicos estudiados en este trabajo, se prosiguió a estudiar la actividad hemolítica de dichos tensioactivos para conocer su citotoxicidad. En la Fig. 3 se puede observar la gran actividad hemolítica de todos los tensioactivos estudiados debido al carácter anfipático de los mismos, siendo más acentuada para los tensioactivos monocatiónicos derivados de la arginina (1212Rac y 1414Rac).
15	Se ha estudiado la actividad leishmanicida frente a <i>L. donovani</i> , promastigotes y <i>L. piñanoi</i> amastigotes axénicos. En la Fig. 1 se ha representado la disminución de la reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio) respecto al control frente a la concentración de tensioactivo catiónico derivado de arginina. En la Fig. 1(panel A) se puede observar una mayor actividad del tensioactivo monocatiónico 1212Rac respecto al dicatiónico 1212R, siendo más evidente para una concentración de tensioactivo de 100µM. Mientras que para el tensioactivo análogo de 14 átomos de carbono, el comportamiento es bien diferente frente a los promastigotes <i>L. donovani</i> (ver Fig.1 panel B).	15	<b>3. Actividad leishmanicida en medio completo de crecimiento (RPMI 1640+ suero fetal bovino inactivado por calor)</b>
20	También se ha realizado el estudio tanto del efecto de la carga de la cabeza polar como de la longitud de cadena de los tensioactivos catiónicos frente a los amastigotes <i>L. piñanoi</i> axénicos. En la Fig. 2 se ha representado la disminución de la reducción de MTT frente a la concentración de tensioactivo. En la Fig. 2 se observa una gran actividad leishmanicida del tensioactivo dicatiónico 1212R, mientras que la actividad del monocatiónico es claramente inferior a concentraciones por debajo de 200µM. En cambio, para los tensioactivos análogos de 14 átomos de cadena hidrocarbonada, la actividad se ve reducida	20	El medio utilizado para el estudio preliminar de la actividad leishmanicida de los tensioactivos mono y dicatiónicos (ver apartado 3.1) consistió exclusivamente en una incubación en medio definido fosfato salino fisiológico, para simplificar el sistema, evitando posibles interacciones con otros componentes proteicos del medio de crecimiento, y posteriormente la reducción de MTT era medida inmediatamente, o, para medida de la proliferación de los parásitos supervivientes tras esta primera incubación en medio definido, se trasplantaba los parásitos a su medio de crecimiento complejo, donde los parásitos supervivientes proliferaban. En los estudios mostrados a continuación, el tensioactivo se añade desde el principio al medio de crecimiento del parásito, es decir, el medio de incubación es el típico de crecimiento contiene suero, RPMI 160 (proteínas y vitaminas y suero fetal bovino 10% para promastigotes y 20% para amastigotes), el aminoácido glutamina y antibióticos para evitar el crecimiento de posibles bacterias y los parásitos no se cambian de medio durante todo el experimento, midéndose únicamente proliferación de parásitos
25		25	En la Fig. 4 se ha representado la actividad leishmanicida de 1212Rac y 1414Rac en función de la concentración de tensioactivo. Se observa una
30		30	

5	<p>reducci3n muy importante de la actividad de ambos tensioactivos respecto a la actividad leishmanicida en suero frente a los promastigotes (PANEL A). Esta complejidad del medio de crecimiento, que incluye componentes proteicos del suero capaces de unir compuestos hidrof3licos y antip3licos es probablemente la causante de dicha inactividad.</p>	10	<p>de la parte hidrof3ba del tensioactivo, pero sí de la carga neta total del sistema, ya que tanto a fracciones molares de 0.8 y 0.6, la carga total neta es positiva, mientras que a fracciones molares de 0.2 y 0.4, la carga total neta es negativa, y la actividad leishmanicida es prácticamente nula, para los dos tensioactivos.</p>
10	<p>Viendo los resultados obtenidos hasta el momento, hay que comentar que ni la carga total neta de los sistemas ni la longitud de la cadena hidrocarbonada afectan en la actividad leishmanicida en promastigotes <i>L. donovani</i>. A continuaci3n se analizarán los mismos sistemas, pero ahora la actividad será frente a los amastigotes <i>L. pifanoi</i> axénicos (Fig. 4 panel B). La actividad de los tensioactivos monocati3nicos estudiados frente a los amastigotes también presenta una actividad inferior que en el caso de utilizar un medio sencillo como el fosfato salino fisiol3gico. Esta p3rdida de actividad es consecuencia de la complejidad del medio, como sucedía en el caso de los promastigotes. A una concentraci3n de 150µM, el 1212Rac presenta una actividad del 27%, mientras que para el 1414Rac, la actividad es del 48%, prácticamente el doble. La actividad frente a los amastigotes, sí es afectada por la longitud de la cadena hidrocarbonada del tensioactivo.</p>	15	<p>Para estudiar el efecto de la carga neta en la actividad frente a los amastigotes, se prepararon sistemas mixtos de fosfatidil glicerol (PG), fosfolípidos de carácter aniónico, y tensioactivo. En la figura 5 se ha representado la disminuci3n de la reducci3n de MTT en funci3n de la concentraci3n total del sistema PG/tensioactivo a diferentes fracciones molares de tensioactivo Fig 6</p>
20	<p>El ensayo fue similar al descrito; es decir, incubaci3n de los parásitos con las preparaciones vesiculares de los tensioactivos durante 6h, y traspaso de los parásitos supervivientes al medio complejo de crecimiento para medir su proliferaci3n, representada en la figura 5. Ambos tensioactivos presentan, a fracciones molares de tensioactivo de 0.8 y 0.6, una actividad leishmanicida del 30% a 400µM. Estos resultados experimentales confirman que la actividad frente a amastigotes <i>L. pifanoi</i> axénicos no depende de la longitud de cadena</p>	25	<p>30</p>



- 11
- REIVINDICACIONES**
1. Uso de un compuesto de fórmula (I)
- 
- Fórmula (I)
- dónde m y n son iguales o diferentes y son un valor entre 6 y 18  
 R<sub>1</sub> es -CO-R<sub>2</sub> o -H  
 R<sub>2</sub> es alquilo C<sub>1-16</sub>  
 X es un halogenuro  
 o sus derivados o solvatos;
- 5
- 12
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde n y m son iguales y tienen un valor que se selecciona entre 8, 10, 12, 14 ó 16.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde R<sub>2</sub> es alquilo C<sub>1-5</sub>.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde X es cloruro.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que además comprende otro principio activo.
- 10

- 15
2. Uso según la reivindicación 2 donde el protozoo es del género *Leishmania*, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infecciones causadas por protozoos.
- 20
3. Uso según la reivindicación 2 donde el protozoo se selecciona entre las especies de *Leishmania* *L. donovani*, *L. pifanoi*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. colombiensi*, *L. braziliensis*, *L. pifanoi*, *L. pifanoi*, *L. ethiopia*, *L. peruviensis*, *L. guyanensis* y *L. arabíga*.
4. Uso según la reivindicación 2 donde el protozoo es del género *Trypanosoma*.
- 25
5. Uso según la reivindicación 4 donde el protozoo se selecciona entre las especies de *Trypanosoma* *T. cruzi*, *T. brucei rhodesiense* o *T. b. gambiense*.

14

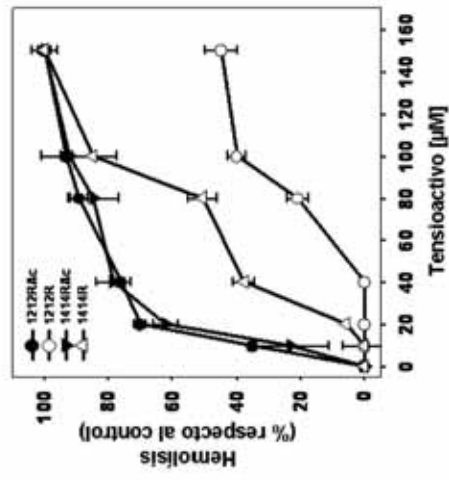


FIG. 3

13

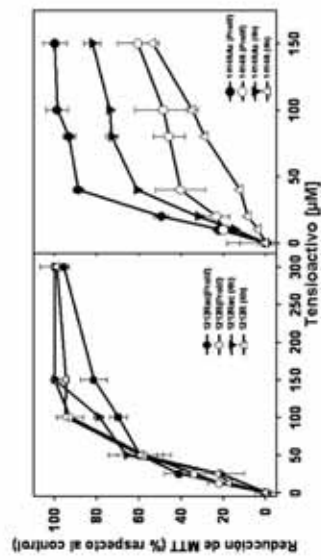


FIG. 1

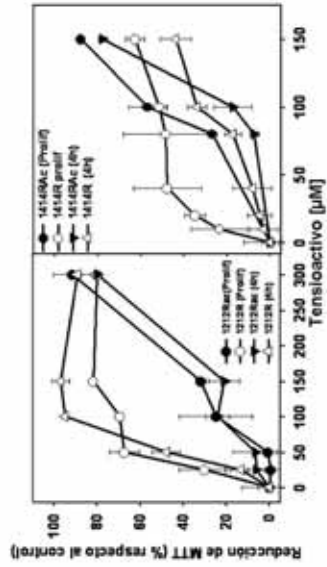
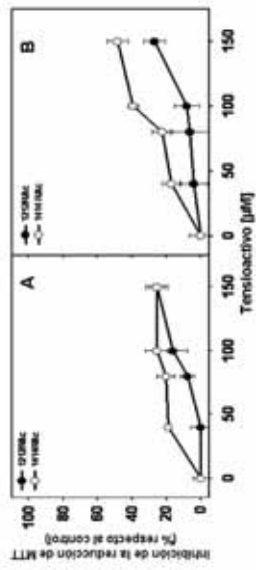


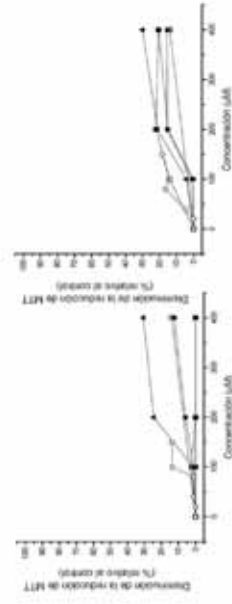
FIG. 2

5

15



5



10

15

20

16

**RESUMEN**

**USO DE ACILGLICEROLES DERIVADOS DE ARGININA COMO  
ANTIPROTOZOARIOS**

5

La presente invención se refiere al uso de un grupo de acilgliceroles derivados de arginina con propiedades tensioactivas que poseen actividad antiparasitaria, más específicamente contra protozoos del género *Leishmania* y *Trypanosoma*.

10





