

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-054148- -00000-0000

Fecha: 2009-05-27 12:22:55 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 83

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I



Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: BIORESPONSE, L.L.C.

Dirección: 568 Rembrandt Road

Nacionalidad o domicilio: Boulder, Estado de Colorado, E.U.A.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐Cual _____
Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE

Dirección: Carrera 13 No. 37-43 Piso 12

Teléfono: 285 74 60 Fax: 285 92 67
E-mail info@castillograu.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ OTRO ☐

Cual _____

Número 79.397.879 de TP 68.995 del
Bogotá C.S.J.

4

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: Michael A. ZELIGS

Dirección 568 Rembrandt Road

Nacionalidad o Domicilio: Boulder, Colorado, E.U.A.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/022649 Fecha: 26/10/2007Publicación Internacional No. WO 2008/057253 A3 Fecha: 15/05/2008

6

Título (54) **MÉTODOS Y COMPOSICIONES ANTI-PARASITICAS QUE UTILIZAN INDOLES
ASOCIADOS CON EL DIINDOLILMETANO**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 31/405

8

Prioridad

Si

☒

No

☐(33) País de origen
E.U.A.

(32) Fecha

27.10.2006

(31) Número de Solicitud

60/854,830

9

Comprobante de pago N°:

Fecha:

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

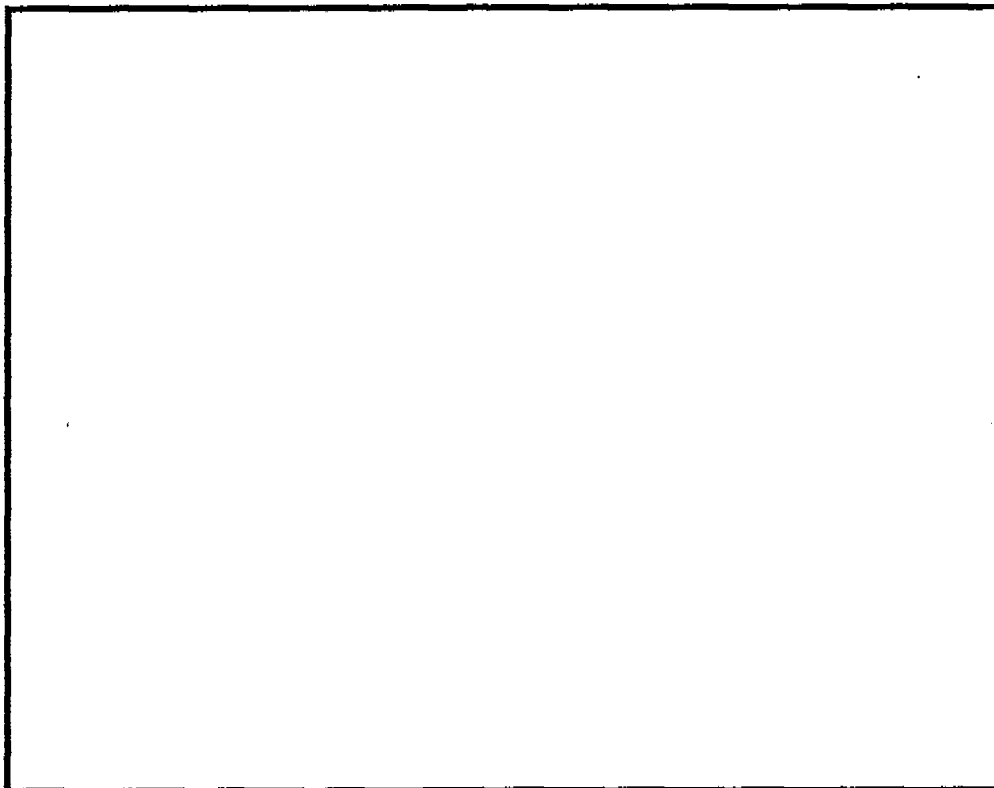
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Documento de Cesión del inventor al solicitante o a su acusante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito de material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

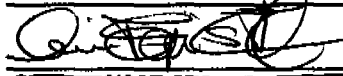
11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de patente,

NOMBRE: LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONEFIRMA: C.C. 79397.879
de BogotáI.P. 68.995
del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

EXTRACTO PARA LA PUBLICACION
SOLICITUD DE PATENTE
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

(21) No. SOLICITUD		(51) INT.CL:	A61K 31/405
(22) FECHA DE PRESENTACION		(71) SOLICITANTE:	BIORESPONSE, L.L.C.
(30) PRIORIDAD		(72) INVENTORES:	
(31) No. DE SOLICITUD	60/854.830	(72) INVENTORES:	Michael A. ZELIGS
(32) FECHA DE PRESENTACION	27.10.2006	(74) APODERADO:	
(33) PAIS	E.U.A.	(74) APODERADO:	Luis Felipe Castillo-Gibson

(54) TITULO: **METODOS Y COMPOSICIONES ANTI-PARASITICAS QUE UTILIZAN INDOLES ASOCIADOS CON EL DIINDOLILMETANO**

(57) REIVINDICACIONES

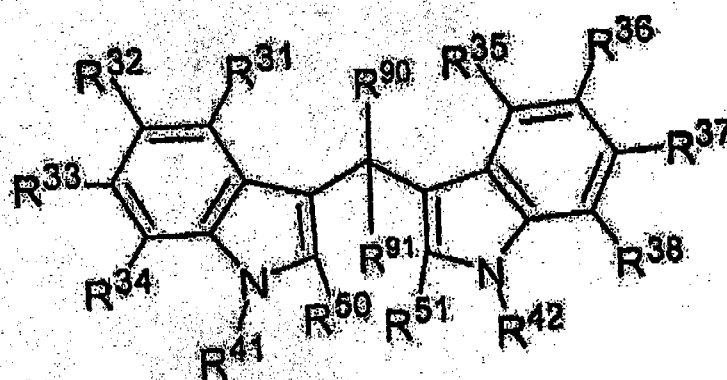
1. Un método para el tratamiento o reducción del riesgo de una enfermedad protozoaria que comprende administrar a un sujeto que lo requiera, una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más indoles asociados con DIM y uno o más agentes antiprotozoarios.

49. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la combinación de uno o más indoles asociados con DIM y uno o más agentes antiprotozoarios.

50. La composición de la reivindicación 49, en donde el uno o más indoles asociados con DIM son seleccionados del grupo compuesto por:

un compuesto de la Fórmula I:

un compuesto de la fórmula I:



5

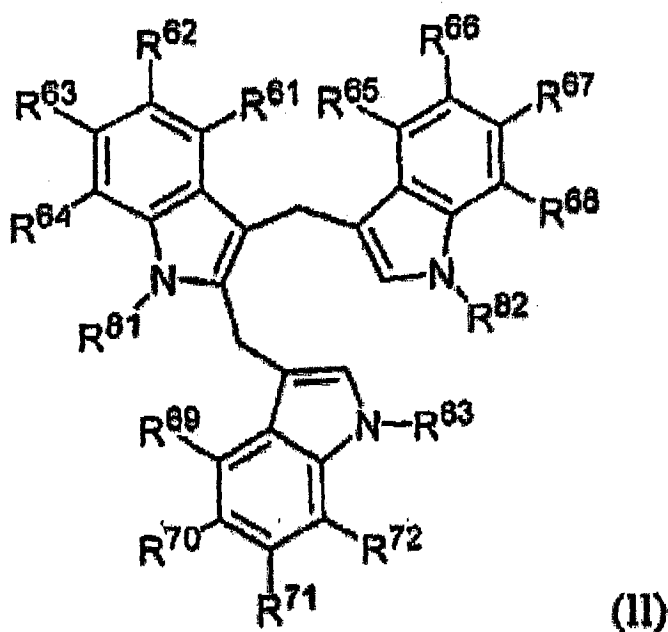
en donde R^{32} y R^{36} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, hidroxilo y metoxi, y grupos etoxycarbonilo, R^{33} y R^{37} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, hidroxilo y metoxi,

R^{31} , R^{34} , R^{35} , R^{38} , R^{41} y R^{31} son hidrógeno,

R^{50} , R^{51} son hidrógeno o metilo, y

R^{90} , R^{91} son hidrógeno;

un compuesto de la fórmula II:

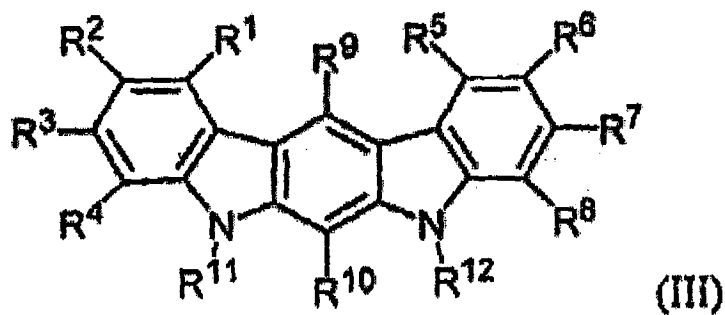


(II)

en donde R^{62} , R^{63} , R^{66} , R^{67} , R^{70} y R^{71} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, hidroxilo y metoxi, y

R^{61} , R^{64} , R^{65} , R^{68} , R^{69} , R^{72} , R^{81} , y R^{83} son hidrógeno;

un compuesto de la fórmula (III):



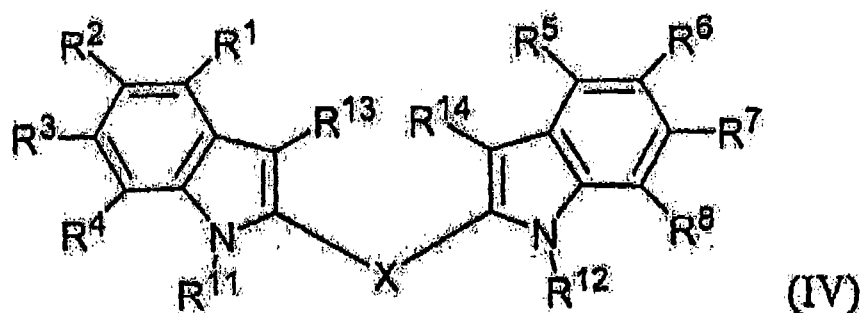
(III)

$R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9$ y R^{10} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_2-C_{24} , alquinilo C_2-C_{24} , arilo C_5-C_{20} , alcarilo C_6-C_{24} , aralquilo C_6-C_{24} , halo, hidroxilo, sulfhidrido, alcoxi C_1-C_{24} , alqueniloxi C_2-C_{24} , alquiniloxi C_2-C_{24} , ariloxi C_5-C_{20} , acilo, aciloxi, alcoxicarbonilo C_2-C_{24} , ariloxicarbonilo C_6-C_{20} , halocarbonilo, alquilcarbonato C_2-C_{24} , arilcarbonato C_6-C_{20} , carboxi, carboxilato, carbamoilo, carbamoilo C_1-C_{24} mono-sustituido, carbamoilo-(alquilo C_1-C_{24})-di-sustituido, cianato, isocianato isotiocianato, azido, formilo, tioformilo, amino, amino(alquilo C_1-C_{24}) mono y di-sustituido, amino(C_5-C_{20}) mono y di-sustituido, alquilamido C_2-C_{24} , arilamido C_6-C_{20} , imino, alquilimino, arilimino, nitro, nitroso, sulfa, sulfonato, alquilsulfanil C_1-C_{24} , arilsulfanil, alquilsulfinil C_1-C_{24} , arilsulfinil C_5-C_{20} , alquilsulfonil C_1-C_{24} , arilsulfonil C_5-C_{20} , fosfono, fosfonato, fosfinato, fosfo, fosfito y combinaciones de lo anterior, y además en donde cualquier dos sustituyentes (orto) adyacentes pueden estar enlazados para forma una estructura cíclica seleccionado de anillos de cinco miembros, anillos de seis miembros y anillos fusionados de cinco y/o seis miembros, en donde la estructura cíclica es aromática, alicíclica, heteroaromática o heteroalíclica y tiene de 0 a 4 sustituyentes de no hidrógeno y de 0 a 3 heteroátomos; y

R^{11} y R^{12} son seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C_1-C_{24} , alcoxicarbonilo C_2-C_{24} , alquilo C_1-C_{24} amino sustituido, alquilo C_1-C_{24} alquilamino C_1-C_{24} sustituido y alquilo C_1-C_{24} di-(alquilo C_1-C_{24}) amino sustituido.

con las condiciones que; al menos uno de $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}$ y R^{12} es diferente de hidrógeno; y cuando $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7$ y R^8 son seleccionados de hidrógeno, halo, alquilo y alcoxi, entonces R^{11} y R^{12} son diferentes de hidrógeno y alquilo.

un compuesto de la fórmula (IV)



en donde

$R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8$ son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C_1-C_{24} , alquenilo

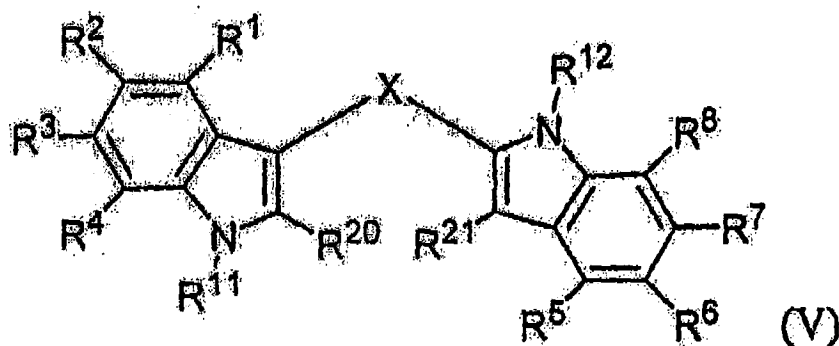
C₂-C₂₄, alquinilo C₂-C₂₄, arilo C₅-C₂₀, alcarilo C₆-C₂₄, aralquilo C₆-C₂₄, halo, hidroxilo, sulfhidrilo, alcoxi C₁-C₂₄, alqueniloxi C₂-C₂₄, alquiniloxi C₂-C₂₄, ariloxi C₅-C₂₀, acilo, aciloxi, alcoxicarbonilo C₂-C₂₄, halocarbonilo, alquilcarbonato C₂-C₂₄, arilcarbonato C₆-C₂₀, carboxi, carboxilato, carbamoilo, carbamoilo (alquilo C₁-C₂₄) mono sustituido, carbamoilo (alquilo C₁-C₂₄) di-sustituido, carbamoilo, arilcarbamoilo mono sustituido, tiocarbamoilo, carbamido, ciano, isociano, cianato, isocianato, isotiocianato, azido, formilo, tioformilo, amino, amino (alquilo C₁-C₂₄) mono y di sustituido, amino (arilo C₅-C₂₀) disustituido, alquilamido C₂-C₂₄, arilamido C₅-C₂₀, imino, alquilimino, arilimino, nitro, nitroso, sulfa, sulfonato, alquilsulfanilo C₁-C₂₄, arilsulfanilo, alquilsulfinilo C₁-C₂₄, arilsulfinilo C₅-C₂₀, alquilsulfonilo C₁-C₂₄, arilsulfonilo C₅-C₂₀, fosfona, fosfonato, fosfinato, fosfo, fosfito y combinaciones de lo anterior, y además en donde dos (orto) sustituyentes adyacentes pueden estar enlazados para formar una estructura cíclica seleccionada de anillos de cinco miembros, anillos de seis miembros y anillos fusionados de cinco y/o seis miembros, en donde la estructura cíclica es aromática, alicíclica, heteroaromática o heteroalíclica, y tiene de 0 a 4 sustituyentes no de hidrógeno y de 0 a 3 heteroátomos, con la condición de que uno pero no ambos de R² y R⁶ sea amino, amino mono-sustituido o amino di-sustituido;

R¹¹ y R¹² son seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C₁-C₂₄, alcoxicarbonilo C₂-C₂₄, alquilo C₁-C₂₄ amino sustituido, alquilo C₁-C₂₄-(alquilamino C₁-C₂₄)-sustituido, y alquilo C₁-C₂₄ di(C₁-C₂₄)amino sustituido;

R¹³ y R¹⁴ se definen como para R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸, con la condición de que al menos uno de R¹³ y R¹⁴ sea diferente a hidrógeno; y

X es O, S, amileno, heteroarileno, CR¹⁵R¹⁶ o NR¹⁷, en donde R¹⁵ y R¹⁶ son hidrógeno, alquilo C₁-C₆, o juntos forman =CR¹⁸R¹⁹, donde R¹⁸ y R¹⁹ son hidrógeno o alquilo C₁-C₆, y R¹⁷ es según se define para R¹¹ y R¹².

un compuesto de la fórmula (V):



en donde

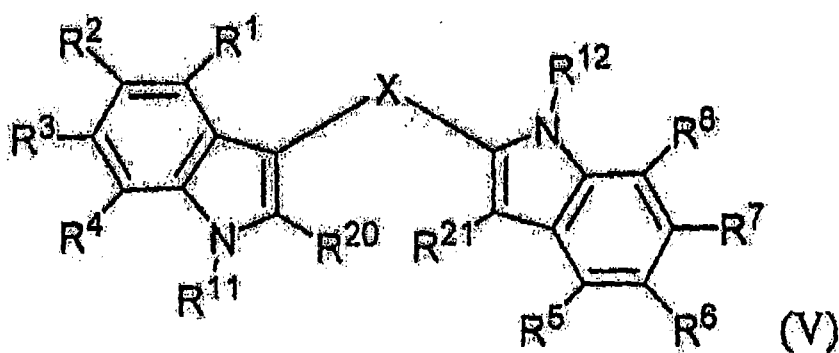
miembros, en donde la estructura cíclica es aromática, alicíclica, heteroaromática o heteroalíclica, y tiene de 0 a 4 sustituyentes no de hidrógeno y de 0 a 3 heteroátomos, con la condición de que uno pero no ambos de R^2 y R^6 sea amino, amino mono-sustituido o amino di-sustituido;

R^{11} y R^{12} son seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C_1-C_{24} , alcoxicarbonilo C_2-C_{24} , alquilo C_1-C_{24} amino sustituido, alquilo C_1-C_{24} -(alquilamino C_1-C_{24})-sustituido, y alquilo C_1-C_{24} di(C_1-C_{24})amino sustituido;

R^{13} y R^{14} se definen como para R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 y R^8 , con la condición de que al menos uno de R^{13} y R^{14} sea diferente a hidrógeno; y

X es O, S, amileno, heteroarileno, $CR^{15}R^{16}$ o NR^{17} , en donde R^{15} y R^{16} son hidrógeno, alquilo C_1-C_6 , o juntos forman $=CR^{18}R^{19}$, donde R^{18} y R^{19} son hidrógeno o alquilo C_1-C_6 , y R^{17} es según se define para R^{11} y R^{12} .

un compuesto de la fórmula (V):



en donde

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^{11} , R^{12} y X se definen como los compuestos de la fórmula (III); y

R^{20} y R^{21} se definen como para, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 y R^8

99

MÉTODOS Y COMPOSICIONES ANTI-PARASÍTICAS QUE UTILIZAN INDOLES ASOCIADOS CON EL DIINDOLILMETANO

1. CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento y prevención de infecciones parasitarias, preferiblemente infecciones parasitarias protozoarias, que utilizan indoles asociados con el diindolilmetano. La administración de indoles asociados con el Diindolilmetano solos o en combinación con agentes antiprotozoarios conocidos, provee un método para promover de manera selectiva la apoptosis de células anfitrionas infectadas por parásitos y de parásitos protozoarios extracelulares. Se cree que la actividad proapoptica directa y la interacción de otros indoles asociados con el Diindolilmetano con otros agentes antiparásitos y proapopticos permite una quimioterapia más efectiva y es complementaria a vacunas antiprotozoarias coadministradas. Los métodos y composiciones de la presente invención ofrecen nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de las principales enfermedades parasitarias protozoarias de mamíferos y aves, incluidas malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis, neosporosis y coccidiosis.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

2.1 Enfermedad relacionada con protozoarios

Los parásitos protozoarios son organismos unicelulares que viven durante algunas o todas las etapas de su ciclo de vida dentro de órganos, tejidos y células de animales multicelulares metazoarios. Como parásitos, estos parásitos obtienen nutrientes del suministro alimenticio del organismo anfitrión o de sus células y tejidos. Como organismos eucarióticos unicelulares eucarióticos, los parásitos protozoarios pueden vivir tanto dentro de células animales como parásitos extracelulares de vida libre residentes en la sangre, tejido linfático o dentro del lumen intestinal.

Como agentes de infección, los parásitos protozoarios son básicamente diferentes de bacterias y virus. Al contrario de las bacterias y de los virus, los parásitos protozoarios son animales y comparten similares necesidades de metabolismo, respiración y nutricionales con sus anfitriones animales. El metabolismo similar de protozoarios con el metabolismo de mamíferos hace que la mayoría de los antibióticos y agentes antivirales, selectivamente activos contra bacterias y virus, respectivamente no tengan efecto para infección protozoaria. La actividad de compuestos con actividad antibacteriana o antiviral contra parásitos

10


protozoarios sería atípica e inesperada. La falta de diferencias entre el metabolismo protozoario y el metabolismo celular del anfitrión requiere novedosos enfoques farmacológicos para encontrar agentes terapéuticos selectivos para eliminar organismos protozoarios que viven dentro de un anfitrión animal. Al contrario de bacterias y virus, los protozoarios puede asumir diferentes formas sexuales y diferenciarse en una variedad de etapas de maduración en varios órganos, presentando desafíos únicos para reconocimiento por parte del sistema inmune anfitrión. Como organismos genéticamente más complejos que las bacterias y los virus, los protozoarios se diferencian en formas que resisten la muerte por microbiocidas conocidos activos contra bacterias y virus (Weir et al., 2002, *Appl Environ Microbiol.* 68(5):2576-9). Por lo tanto, el desarrollo de productos terapéuticos antiprotozoarios efectivos y la estimulación de respuestas inmunes del anfitrión contra parásitos protozoarios requiere enfoques diferentes de los que se utilizan para desarrollar agentes antibacteriales, antivirales y agentes potenciadores inmunes generales.

Los parásitos protozoarios primarios que causan enfermedad en el hombre incluyen hemoflagelados de la clase *Tripanosomatidea*, que causan Leishmaniasis y Tripanosomiasis, y parásitos del filo Apicomplexa, clase *Coccidea*, que causan paludismo, toxoplasmosis, criptosporidiosis y bebesiosis. Las especies de *Coccidea* pueden infectar humanos, animales domésticos y animales de granja, incluidos aves de corral, corderos, terneros, lechones y conejos. Las enfermedades parasitarias protozoarias asociadas con paludismo incluyen enfermedad causada por parásitos de la especie *Neospora*. Las infecciones de *Neospora* se presentan en perros, ganado vacuno, ovejas, cabras y caballos.

La mayoría de las poblaciones en los países en desarrollo se encuentra ahora en alto riesgo de varias infecciones protozoarias incluidas malaria, leishmaniasis y tripanosomiasis. En conjunto, estas enfermedades protozoarias causan millones de muertes prevenibles cada año. Por ahora no existen vacunas preventivas o terapéuticas para estas enfermedades parasitarias. El mercado para medicamentos contra este tipo de enfermedades es muy limitado debido a pobreza y a la emergencia de resistencia a la quimioterapia actual de un solo agente. Tal como se utiliza en este contexto, quimioterapia se refiere al uso de sustancias químicas para tratar una enfermedad. Debido a la falta de inmunidad protectora luego de la infección, con o sin quimioterapia, la reinfección es un fenómeno común. Por lo tanto, se requieren medicamentos innovadores y económicos en terapias de combinación que usen productos fármacos nuevos y antiguos. Se prefiere el desarrollo de agentes antiparasíticos de amplio espectro para reducir la emergencia de nueva resistencia. Un medicamento antiprotozoario

ideal identificaría múltiples parásitos protozoarios, sería activo por varias rutas de administración, reduciría la morbilidad y la mortalidad causadas por este tipo de infecciones, no interferirían con vacunas coadministradas a medida que estuvieran disponibles y reducirían la necesidad de tratamiento hospitalario.

Las principales fuentes protozoarias de infección abordadas por los métodos de tratamiento y composiciones de la presente invención son un subconjunto de organismos protozoarios dentro del reino biológico Protista. La Tabla 1 presenta un resumen de los protozoarios relevantes a la presente invención.

<u>Filo</u>	<u>Clase</u>	<u>Orden</u>	<u>Gen</u>	<u>Especie</u>
	Microsporidia			<i>Enterocytozoon blaneusi</i>
Chromista	Bigyia			<i>Blastocystis hominis</i>
Parabasalia	Axostylata	Parabasalea		<i>Trichomonadida</i>
				<i>Trichomonas vaginalis</i>
Euglenozoa	Subphylum Kinetoplasta	Trypanosomatidea	Trypanosomatida	
			Leishmania	<i>Leishmania species</i>
				<i>donovani, infantum (chagasi), tropica, brazillensis, guyanensis</i>
			Trypanosoma	<i>Trypanosoma species</i>
				<i>Brucel, gambiense, rhodesiense</i>
				<i>Trypanosoma cruzi</i>
				<i>Trypanosoma rangeli</i>
Aplicomplexa (Sporozoa)	Coccidia	Adelcida		<i>Cryptosporidium baileyi</i>
				<i>Cryptosporidium meleagridis</i>
				<i>Cryptosporidium parvum</i>
				<i>Cryptosporidium muris</i>
				<i>Cyclospora cayentanensis</i>
				<i>Isospora belli</i>
			Cystoisospora	<i>Cystoisospora</i>
		Eimeriida		<i>Toxoplasma gondii</i>
		Haemosporida	Plasmodium	<i>Plasmodium falciparum</i>
				<i>Plasmodium malariae</i>
				<i>Plasmodium ovale</i>
				<i>Plasmodium vivax</i>
				<i>Babesia gibsoni</i>
				<i>Babesia microti</i>
		Conoidasida	Eucoccidiorida	<i>Neospora</i>
				<i>Sarcosystis hominis</i>
				<i>Sulhominitis, lindemanni</i>

12
X

Tabla 1. Campo seleccionados de parásitos relevantes a los métodos y composiciones de tratamiento que utilizan indoles asociados con el DIM.

2.2 Alcance de infecciones parasitarias protozoarias

Los protozoarios parasíticos son responsables por una variedad de enfermedades humanas transmitidas por vectores de insectos, es decir, vehículos, incluidos malaria, leishmaniasis y tripanosomiasis. Otros parásitos protozoarios pueden transmitirse directamente de otros reservorios mamíferos o de persona a persona. La falta de vacunas, control de vectores y quimioterapia selectiva han sido las únicas formas de reducir la transmisión y tratar a los individuos infectados, respectivamente. Debido a que el sistema inmune juega un papel crucial para el control de infecciones protozoarias, la infección oportunística con organismos protozoarios es un problema creciente en infantes, pacientes con cáncer, receptores de transplante las personas co-infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). El embarazo también suprime ciertas funciones inmunes. Se requieren nuevos tratamiento antiprotozoarios que sean más seguros para la madre y el feto durante el embarazo, en particular para infecciones de malaria, toxoplasmosis y tricomonas. Se requieren vacunas que superen respuestas inmunes disminuidas e induzcan una respuesta inmune adecuada a largo plazo. Las vacunas pueden usarse junto con quimioterapia compatible para mejorar la terapia de una infección crónica preexistente en áreas endémicas.

2.2.1 La malaria es una enfermedad protozoaria no controlada

La malaria surge de una infección con un parásito protozoario *Apicomplexan* conocido como *Plasmodium*. Solo cuatro especies del gen *Plasmodium* causan malaria humana. *P. vivax* es el más común y fatal. *P. ovale* y *P. malariae* son menos comunes y son de una gravedad intermedia. *P. falciparum* es el más virulento, responsable por una alta mortalidad infantil y asociado con la actual resistencia a medicamentos. La enfermedad es transmitida a los seres humanos por medio de la picadura de mosquitos *Anopheles* hembras infectados y por transfusión de sangre infectada.

Debido a la emergencia y diseminación de parásitos de malaria resistentes a medicamentos, mosquitos transmisores de malaria resistentes a pesticidas y crecimiento de la población en áreas endémicas, la malaria causa hoy en día aproximadamente 500 millones de casos clínicos por año. La malaria es prevalente en niños y mujeres embarazadas, y causa cerca de un millón de muertes anuales en niños mejores de cinco años. Los niños que crecen en áreas

12
X

rurales y endémicas están sujetos a más enfermedades y muertes frecuentes asociadas con malaria que más adultos resistentes.

La forma más severa de infección con *Plasmodium falciparum* es la malaria cerebral (MC). La malaria cerebral implica la presencia de características neurológicas, en particular, alteración del estado de conciencia. El tratamiento de la MC se limita a unos pocos medicamentos convencionales antimaláricos (quinina o artemisininas) y atención de soporte, incluidos fluidos parenterales, transfusión de sangre, diuréticos osmóticos y corrección de hipoglicemia, acidosis e hipovolemia. El manejo de PC incluye una pronta administración de agentes antimaláricos parenterales apropiados y un temprano reconocimiento y tratamiento de las complicaciones. En niños, las complicaciones incluyen anemia severa, ataques y presión intracraneal elevada. En adultos, falla renal y edema pulmonar son las causas más comunes de muerte.

Para el tratamiento de la malaria se ha desarrollado una serie de medicamentos que van desde los de origen natural hasta sintéticos. Quinina y artemisinina son los medicamentos comúnmente conocidos de origen naturales que se usan para el tratamiento de paludismo. En la literatura se conoce una serie de medicamentos antimaláricos sintéticos tales como cloroquina, mefloquina, primaquina, halofantrín, amodiaquina, proguanil, atovacuona y maloprim. Para el tratamiento de malaria también se usa Gluconato de Quinidina, Sulfato de Quinina, típicamente en combinación con Doxiciclina hiclato, Clindamicin o Pirimetamina-sulfadoxina. En cepas resistentes a cloroquina, la terapia oral preferida incluye combinaciones de Clorhidrato de Mefloquina y clorhidrato de Atovacuona-proguanil. Para el tratamiento de infecciones con *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. falciparum* sensible a cloroquina se usa fosfato de cloroquina y fosfato de primaquina.

En los últimos años, la malaria resistente a medicamentos se ha convertido en uno de los problemas más serios para el control de la malaria. La resistencia a fármaco necesita el uso de medicamentos que son más costosos y pueden tener efectos secundarios peligrosos. La emergencia de la resistencia puede prevenirse mediante el uso de combinaciones de fármacos con diferentes mecanismos de acción. El uso de combinaciones de fármacos para todo el tratamiento antimalárico no solo demora el comienzo de la resistencia al fármaco sino que también acelera la recuperación y aumenta las tasas de curación. En el campo de la quimioterapia malarica ya se conoce un número de combinaciones antimaláricas. Se han resumido las combinaciones específicas en uso, dosis y

méritos relativos de las varias combinaciones (Kremsner *et al*, 2004, Lancet 364:285-94)

Con la emergencia de cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina y quinina se requiere otra quimioterapia antimalárica alternativa. Debido a reinfección frecuente luego de un tratamiento completo o parcial, se requiere una terapia con vacunas que estimule la inmunidad de reinfección a largo plazo. Preferiblemente, una nueva quimioterapia curará la infección actual y no interferirá con vacunas coadministradas a medida que estén disponibles. Las combinaciones preferidas de antimaláricos utilizan medicamentos que superan la resistencia a la cloroquina, tienen un perfil de seguridad bueno y se toleran bien. La artemisinina obtenida de la planta *Artemisia annua* y sus derivados son rápidamente efectivos en malaria severa. Los compuestos de artemisinina han sido evaluados en varios centros y se ha encontrado que son eficaces y seguros (Miskra *et al.*, 1995, *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89:299-301).

Además, la literatura de patentes describe la combinación de atovacuona y proguanil como un método para el tratamiento de malaria. Ver Patente U.S. No. 5,998,449. La combinación de fenozan con otro agente antimalárico seleccionado de artemisinina, artesunato sódico, cloroquina o mefloquina se describe para el tratamiento profiláctico y curativo de la malaria. Ver Patente U.S. No. 5,834,505. Kits de combinación sinérgica que usan derivados de artemisinina, sulfadoxin y pirimetamina para malaria severa resistente a múltiples fármacos los describe Tipathi *et al*., en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No 2006/0141024 A1.

2.2.2 Falta de una quimioterapia efectiva para Tripanosomiasis al comienzo y al final de la enfermedad

La tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño) es causada por una subespecie del hemoflagelado parasítico, *Tripanosoma brucei*. La infección comienza con la picadura de un tse-tse infectado (*Glossina spp.*) Se conocen dos formas de la enfermedad; una causada por *Tripanosoma brucei rhodesiense*, endémico en Sud África y África Oriental y la otra causada por *T.b. gambiense*, detectado originalmente en África Occidental, pero también diseminada en África Central. La *Tripanosomiasis African* resulta en una enfermedad febril que pone la vida en peligro en humanos y también en ganado. Los parásitos *T. brucei* invaden rápidamente el Sistema Nervioso Central (SNC) y causando la muerte en cuestión de semanas si no se recibe tratamiento. Los parásito *T.b. gambiense* se proliferan relativamente lento y puede tomar varios años antes de infectar el sistema SNC. Para tratar estas infecciones existen cuatro medicamentos importantes aprobados. Dos de éstos, pentamidina y suramin, se usan antes de

14

que se comprometa el SNC. El medicamento basado en arsénico, melarsoprol se utiliza en el caso de infecciones establecidas en el SNC. El cuarto medicamento, eflornitina se utiliza contra infección en etapa tardía causada por *T.B. gambiense*. Este fármaco no tiene efecto contra *T.b. rhodesiense*. Nifurtimox es otro medicamento aprobado para tripanosomiasis americana y enfermedad tardía refractaria a melarsoprol.

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chaga es causada por *Tripanosoma cruzi* y afecta a millones de personas en Sur y Centro América y México. La enfermedad de Chaga no tratada causa una expectativa de vida reducida debido a cardiomiopatía parasítica y falla cardíaca, megaesófago y megacolon. Los bichos triatómidos succionadores de sangre transmiten la infección a niños y puede presentarse una infección transplacentar con parasitemia durante el embarazo. Nifurtimox y benznidazol son dos medicamentos que se usan para el tratamiento de la enfermedad aguda, pero no se conoce que sean terapéuticos para la infección crónica en niños mayores y adultos. A falta de una vacuna efectiva, se requieren mejores agentes que puedan ser tomados en forma profiláctica por niños en riesgo. Luego de la infección, se requieren otros agentes para uso en conjunto con nifurtimox y benznidazol para aumentar la eficacia, permitir dosis más bajas de los agentes actuales con toxicidad reducida y acortar la actual duración requerida para el tratamiento.

2.2.3 Falta una quimioterapia práctica y segura contra Leishmaniasis .

La leishmaniasis humana comprende un espectro heterogéneo de enfermedades. Generalmente se distinguen tres formas principales: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral, de las cuales la última es potencialmente letal. Estas enfermedades son causadas por varias especies del parásito protozoario *Leishmani* y son transmitidas por las moscas de arena. En la actualidad se estima que la enfermedad afecta aproximadamente a 12 millones de personas en 88 países. A nivel mundial, la coinfección leishmania/VIH es considerada como una enfermedad emergente en la que aproximadamente 50% de los casos de leishmaniasis visceral en adultos están asociados con infección VIH coexistente.

El tratamiento actual para leishmaniasis involucra la administración de antimonio pentavalente complejo a un carbohidrato en la forma de estibogluconato sódico (Pentosam o Sb(v)) o antimoniato de meglumina (Glucantina), que son los únicos agentes quimioterapéuticos antileishmaniales establecidos con un índice terapéutico claramente favorable. La estructura química exacta y modo de acción de antimoniales pentavalentes es aún incierta.

16
15

Anfotericina B y Pentamidina son la segunda línea de agentes anti-leishmaniales, pero están reservados para infecciones no respondientes debido a toxicidad potencial. Puesto que la resistencia a medicamentos anti-Leishmaniasis basados en antimonio es emergente y las fallas en el tratamiento son comunes, se requieren nuevas terapias de combinación. Miltefosina es un medicamento oral introducido recientemente y efectivo para enfermedad visceral y cutánea. La importancia de este nuevo agente oral se extiende al tratamiento de perros que sirven como un depósito importante de la enfermedad. La identificación de otros agentes anti-leishmaniasis nuevos y eficaces para administración oral permitiría otras opciones de tratamiento, ayudaría a prevenir la resistencia emergente de Miltefosina y fármacos basados en antimonio y aumentarían la probabilidad para el control regional de leishmaniasis. Se ha demostrado que DIM es un potente inhibidor de la topoisomerasa tipo I de *Leishmania donovani* (LdTOPILS) con un IC₅₀ de 1.2 µM. Ver Roy et al., *Biochemical Journal*, 8 de octubre de 2007, *Immediate Publication Manuscript BJ 20071286* (no la versión final).

2.2.4 Enfermedad tricomonal

La infección tricomonas típicamente vulvo-vaginitis en mujeres y uretritis en hombres, es adquirida sexualmente y es una de las infecciones de parásitos protozoarios más comunes en humanos. En los Estados Unidos se estima que más de 2 millones de mujeres se infectan cada año. La *Trichomonas vaginitis* causa picazón vulvar y una descarga vaginal olorosa. Esta enfermedad es causada por *Trichomonas vaginalis*, un parásito protozoario unicelular que no se encuentra normalmente en la flora del tracto genitourinario. Normalmente, la infección tricomonas es tratada con metronidazol oral, un fármaco aprobado por la FDA en varios regímenes de dosis. Aunque es eficaz, el Metronidazol puede presentar serios efectos secundarios asociados con la dosis, en particular en la sangre y en el sistema nervioso central. Experimentos demuestran que es mutagénico y carcinogénico. Recientemente, se ha documentado falla en el tratamiento y resistencia emergente a metronidazol, lo que indica la necesidad de terapias efectivas más consistentes que incluyan combinaciones de fármacos activos contra las cepas de *T. vaginalis* que puedan ser resistentes a metronidazol. Tratamientos preferidos incluyen agentes seguros para mujeres embarazadas y permiten dosis más bajas de metronidazol co-administrado.

2.2.5 Enfermedad protozoaria en Huéspedes inmunocomprometidos

El riesgo de enfermedades parasitarias también está presente fuera de los países en desarrollo y frecuentemente toma la forma de enfermedad diarreica crónicas en sujetos con deficiencia inmune subyacente. Estas infecciones

14
76

pueden ser causadas por *Isospora belli* y *Cyclospora cayetanensis*, ambos protozoarios coccidianos, donde la infección resulta en diarrea autolimitada en huéspedes normales y diarrea prolongada en individuos con SIDA. *Cryptosporidia* son parásitos coccidianos adicionales que causan diarrea en especies animales y en seres humanos. *Cryptosporidium parvum* y *C. Hominis* son responsables por la mayoría de las infecciones coccidiales en humanos. Estos organismos forman oocitos, los cuales cuando son digeridos liberan esporozoitos que invaden las células epiteliales anfitrionas, penetrando la membrana celular pero no el citoplasma enterocito. Nitazoxanida es el único medicamento aprobado en los Estados Unidos para el tratamiento de criptosporidiosis. La identificación de otros agentes anti-criptosporidiales efectivos para uso oral permitiría otras opciones de tratamiento para individuos con infección VIH que responda impredeciblemente a Nitazoxanida.

Toxoplasmosis es una infección zoonótica causada por el protozoario intracelular obligado *Toxoplasma gondii*. La toxoplasmosis se encuentra en todo el mundo, incluido Estados Unidos. Gatos y otras especies felinas son los anfitriones naturales de *Toxoplasma gondii*, sin embargo se han recuperado quistes en tejidos (bradizoitos) de todas las especies mamíferas examinadas. Las mujeres embarazadas y las personas con sistemas inmunes débiles son especialmente susceptibles a los riesgos de salud que resultan de la infección con *Toxoplasma*. La toxoplasmosis severa, en particular exposición transplacentar puede resultar en daño al cerebro, ojos y otros órganos en desarrollo *in utero*. Los tratamientos actualmente disponibles para toxoplasmosis, que son los fármacos trisulfapirimidina, sulfadiazina y pirimetamina no son efectivos, y pueden ser tóxicos para el anfitrión. Por lo tanto, existe la necesidad de agentes terapéuticos para tratar toxoplasmosis que sean más efectivos y menos tóxicos que los agentes de tratamiento disponibles en la actualidad. No existe ningún agente para controlar la Toxoplasmosis en gatos.

2.3 El comportamiento de la célula protozoaria incluye respuestas parecidas a apoptosis y supresión de apoptosis en células anfitrionas infectadas.

Apoptosis es el proceso de muerte celular programada mediante el cual las células dañadas son eliminadas por la generación de señales de muerte no opuestas dentro de la célula dañada. Si bien la apoptosis es considerada principalmente como una respuesta biológica de organismos multicelulares que proveen medios para eliminar células infectadas o transformadas en el marco de una enfermedad viral asociada con cáncer, también se ha observado que los

10

organismos protozoarios exhiben un comportamiento de muerte celular programada (Lee et al, 2002, *Cell Death Differ.* 9:53-64). También se ha observado que cuando infectan las células anfitrionas en mamíferos, los parásitos protozoarios suprimen la apoptosis de la célula anfitriona. Por ejemplo, se ha descrito la activación del trayecto de señales de supervivencia *Factor Nuclear Kappa B* (NF- κ B) luego de la infección con *Tripanosoma cruzi* (Petersen et al, 2006, *Infect Immun.* 74:1580-7).

2.4 Compuestos Indol naturales pueden influenciar apoptosis

Los vegetales crucíferos contienen una familia de compuestos protectores de plantas denominados glucosinolatos que dan lugar a compuestos activos con los anillos indol ejemplificados por indol-3-carbinol (I3C). La ingestión oral de I3C resulta en la conversión gástrica de I3C en al menos veinte productos de condensación ácida, muchos de los cuales son biodisponibles, los más prevalentes de los cuales incluyen: CTR (trimero cíclico; 5,6,11,12,17,18-hexahidrociclonona[1,2,-b:4,5-b':7,8-b'']triindol), HI-IM (1-(3-hidroximetil)-indolil-3-indolilmetano), DIM (diindolilmetano), ICZ (indolocarbazol) y LTR-1 (timero lineal; [2-(indol-3-ilmetil)-indol-3-il]indol-3-ilmetano) (Stresser et al., 1995, *Drug Metabolism and Disposition* 23:965-975). El hecho de que existan muchos productos de condensación ácida de I3C que no sean DIM, producidos *in vivo* a niveles iguales o mayores que DIM, los cuales pueden ser responsables por la actividad I3C, requiere que las actividades biológicas de productos de condensación individual como DIM se demuestren directamente.

Como uno de los muchos productos derivados de I3C, DIM también está presente en plantas crucíferas luego de la liberación de I3C. Una vez formado, DIM es estable en ácido. En cultivo celular, se ha demostrado que DIM aislado tiene efectos que inducen la apoptosis tanto en células cancerígenas dependientes de estrógeno como en células cancerígenas independientes de mama (Hong et al., 2002 *Biochem Pharmacol.* 63:1085-97). En animales, DIM administrado oralmente inhibe el crecimiento de ciertas formas de cáncer de mama inducidas químicamente (Chen et al., 1998, *Carcinogenesis* 19:1631-9). Recientemente, se ha demostrado que DIM induce específicamente apoptosis en líneas de células cancerígenas cervicales alteradas por oncogeno del Virus del Papilloma Humano (VPH) (Chen et al., 2001, *J Nutr.* 131:3294-3302). En otros experimentos de cultivos celulares, se ha demostrado que DIM reduce la activación del trayecto de señales NF κ B en células cancerígenas de mama (Rahman et al, 2005 *Cancer Res.* 65:364-71). No se probaron otros productos de condensación I3C que no fueran DIM. Estudios *in vivo* sugieren que los niveles de plasma efectivos

19

esperados de DIM no se logran fácilmente en humanos (Anderton *et al.*, 2004 *Drug Metab Dispos.* 32:632-8).

Con respecto a su actividad pro-apóptica en células tumorales, también se ha demostrado que DIM es estrogénico en células cancerígenas de mama (Riby *et al.*, 2000, *Biochem Pharmacol.* 60:167-177) y en trucha arco iris, un modelo de carcinogenesis relevante a cáncer en humanos (Shilling *et al.*, 2001, *Toxicology and Applied Pharmacology* 170:191-200). Debido a que los efectos estrogénicos inhiben la apoptosis, DIM puede aumentar realmente el crecimiento asociado con estrógenos y la supervivencia de algunas células. Basados en los resultados conflictivos de la actividad de DIM en estudios de cultivo celular y actividad estrogénica *in vivo*, es difícil predecir los efectos *in vivo* de DIM en procesos de enfermedad protozoaria. Adicionalmente, se ha demostrado que DIM activa el trayecto de señales celulares de la Proteínas quinasas activadas por Mitógenos (MAPK) en cultivo celular (Leong *et al.*, 2004, *Mol Endocrinol.* 18:291-302). MAPK activada es asociada con la promoción de cáncer, supervivencia de células cancerígenas e inhibición de apoptosis. Estas propiedades de DIM sugieren que DIM no sería útil como promotor de apoptosis en infección protozoaria.

Un enfoque que no ha sido desarrollado para enfermedad parasitaria protozoaria sería el de inducir apoptosis de manera selectiva en células y tejidos protozoarios infectados con el fin de causar la muerte programada de parásitos y de células infectadas por parásitos. Esto resultaría en la limpieza de parásitos y una apoptosis aumentada puede apoyar el desarrollo de inmunidad protectora de anfitrión.

3. RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a indoles de Diindolilmetano (DIM) e indoles asociados con el DIM útiles para el tratamiento y prevención o reducción del riesgo de enfermedades protozoarias en mamíferos y aves. La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden indoles asociados con el DIM, opcionalmente en combinación con uno o más agentes antiprotozoarios adicionales. En algunas realizaciones, los compuestos y métodos de la presente invención se usan para el tratamiento o prevención o reducción del riesgo de infecciones causadas por los parásitos protozoarios primarios que afectan a los seres humanos, incluidos, mas no limitados a hemoflagelados de la clase *Trypanosomatidae*, causantes de leishmaniasis y tripanosomiasis, flagelados de la clase *Axostylata* causante de la infección *Tricomonas*, y parásitos del filo, *Apicomplexa*, causante de malaria, toxoplasmosis, criptosporidiosis y bebesiosis.

70
X

Cubiertos también por los métodos de infecciones están los hongos del gen *Candida*, en particular *C. albicans*, que se comportan como protozoarios intracelulares invadiendo células epiteliales. En ciertas realizaciones, los compuestos y métodos de la presente invención se usan para el tratamiento o prevención o para reducir el riesgo de infecciones que afectan a mamíferos no humanos, incluidas, mas no limitadas a enfermedades parasitarias protozoarias relacionadas funcionalmente con malaria causada por parásitos de la especie *Neospora*. Se sabe que las infecciones de *Neospora* se presentan en perros, ganado, ovejas, cabras y caballos. En ciertas realizaciones, los compuestos y los métodos de la presente invención se usan para el tratamiento o prevención o para reducir el riesgo de infecciones causadas con especies de *Coccidea*, también del filo *Apicomplexa*, que infecta a humanos, animales domésticos y ganado, incluidas aves de corral, corderos, terneros, lechones y conejos. Tal como se utiliza en este contexto, un sujeto incluye, mas no se limita a seres humanos, animales domésticos tales como perros, y animales de granja tales como aves de corral, ovejas, corderos, lechones, conejos, ganado, terneros, cabras y caballos. En ciertas realizaciones, los compuestos y métodos de la invención se usan para el tratamiento o prevención o para reducir el riesgo de infección causada por *Cyclospora*, *Isospora* o *Blastocystis*.

En ciertas realizaciones, los métodos de la invención emplean compuestos sustituidos de diindolilmetano, derivados sintéticamente y estructuralmente asociados referidos como indoles asociados con el DIM para tratar infecciones parasitarias protozoarias. En realizaciones particulares, el o los indoles asociados con el DIM de la invención son seleccionados del grupo compuesto por 3,3'-diindolilmetano (DIM), DIM hidroxilados, DIM metoxilados, 2-(Indol-3-ilmetil)-3,3'-diindolilmetano (LTR), LTR hidroxilados, LTR metoxilados, 5,5'-dimetilDIM (5-Me-DIM), 2,2'-dimetilDIM (2-Me-DIM), 5,5'-dicloroDIM (5-Cl-DIM), imidazolil-3,3'-diindolilmetano, imidazolil-3,3'-diindolilmetanos sustituidos con nitro, 2,10-dicarbetoxi-6-metoxi-5,7-dihidro-indolo-[2,3-b]carbazol, 6-etoxicarboniloxi-5,7-dihidro-indolo-[2,3-b]carbazol y 2,10-dicarbetoxi-6-etoxicarboniloxi-5,7-dihidro-indol[2,3-b]carbazol y 2,6-dicarbetoxi-3,3'-dimetil-13,14-diindolilmetano e indol-3-carbinol (I3C).

En ciertas realizaciones, el indol o indoles asociados con el DIM se usan en combinación con productos terapéuticos antiprotozoarios. Los agentes antiprotozoarios que son combinados con indoles asociados con el DIM según la presente invención, incluyen fármacos antiprotozoarios establecidos, fármacos antiprotozoarios derivados de producto natural, fármacos que inducen la apoptosis frecuentemente con una historia de uso como productos quimioterapéuticos que

inducen la apoptosis y productos naturales de plantas con actividad antiprotozoaria. Agentes antiprotozoarios establecidos para uso combinado incluyen atovacuona, amodiaquina, anfotericina, butoconazol, clindamicina, eflornitina, fumagilin, yodoquinol (diiodohidroxiquin), clioquinol (yodoclorhidroxiquin), Etanidazol, Benznidazol, fluoroquinolonas, enoxacina, ciprofloxacina, doxiciclina, melarsoprol, metronidazol, miltefosina, nifurtimox, nitazoxanida, paromomicina, pentamindina, estibogluconato sódico, suramina, tinidazol, pirimetamina, proguanil (cloroguanida), espiromicina y sulfadoxina. Los fármacos antiprotozoarios derivados de productos naturales útiles para uso combinado incluyen lactosas de sesquiterpeno relacionadas con artemisinina de *Artemisia annua*, en particular artemisinina, dihidroartemisinina, arteméter, artesunato y otros derivados de artemisinina, quinolinas como quinina derivadas de la corteza del árbol *chinchona* de Sur América, incluidas quinina y quinolinas relacionadas con quinina, halofantrina, mefloquina, lumefantrina, amodiaquina, pironaridina, piperquina, cloroquina, hidroxicloroquina, naftoquina, primaquina y tafenoquina, curcuminoides derivados de curcumina un extracto de *Curcuma domestica*, incluidos 6-gingerol y 6-paradol, coronaridina, 18-metoxicoronaridina, flavonoides seleccionados, incluidos luteolina, extractos del pericarpio de la fruta de *Sapindus mukorossi*, y extractos de *Yucca schidigera*. Agentes antiprotozoarios que inducen la apoptosis para uso combinado incluyen derivados de artemisinina, atovacuona, cloroquina, yodoquinol (diiodohidroxiquina), clioquinol (yodoclorhidroxiquina), estibogluconato sódico y curcumina. Algunos productos quimioterapéuticos usados que inducen la apoptosis también son útiles en combinación con indoles asociados con el DIM e incluyen Piroloquinazolinodiamina, Novobiocina, ciclosporina, ácido dihidrobetulínico, campotectinas, especialmente topotecan, irinotecan, SN38 (el metabolito activo de irinotecan), bortezimib, etoposida, salvicina y doxorubicina. Productos naturales antiprotozoarios útiles con los métodos de la presente invención incluyen té y extractos hechos de *Artemisia annua*, té y extractos hechos de *Curcuma domestica*, extractos de ajo que incluyen alicina y otros tiosulfatos, extractos de raíz de *Uvaria chamae* (*Annonaceae*) e *Hippocratea Africana* (*Hippocrateaceae*), y extractos de raíz de *Homalium letestui*. Agentes preferidos para uso combinado con indoles asociados con el DIM incluyen extractos de artemisinina y fármacos asociados, curcumina y fármacos asociados con curcumina y otros agentes antiprotozoarios con medias vidas metabólicas cortas. Antimaláricos preferidos específicos con metabolismo rápido incluyen artesunato, dihidroartemisinina, quinina y clindamicina.

27

En una realización en particular, el indol asociado con el DIM y un agente antiprotozoario son administrados de manera simultánea. En otra realización, el indol asociado con el DIM y al agente antiprotozoario son administrados en corto tiempo el uno después del otro, por ejemplo 30 segundos, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 4 horas, 8 horas, 12 horas o 24 horas el uno después del otro.

En una realización adicional, la combinación de un indol asociado con el DIM y un agente antiprotozoario es administrada en conjunto con un agente promotor de diferenciación que ayuda a que las células infectadas con protozoarios se desarrollen en células mas diferenciadas completamente y terapéuticamente sensitivas. Los agentes promotores de diferenciación incluyen Vitamina-D, derivados de Vitamina-D, Vitamina-A (retinoides), ácido 9-cis-Retinóico, ácido 13-cis-Retinóico, ácido trans-Retinóico, all-trans-Retinol, retinil acetato, Retinil palmitato y factores estimulantes de colonias de granulocitos/macrófagos que incluyen Filgrastim humano recombinante y Sargramostim.

En una realización adicional, la combinación de un indol asociado con el DIM y un agente antiprotozoario es administrada junto con vacunas antiprotozoarias que contienen organismos protozoarios atenuados, típicamente inactivados mediante irradiación y/o procesamiento químico. Alternativamente, el indol asociado con el DIM, el agente antiprotozoario y la vacuna antiprotozoaria son administradas con un agente potenciador inmune adicional (que no sea un indol asociado con el DIM). Agentes potenciadores inmunes útiles en los métodos de la presente invención incluyen extractos de aloe vera, manana y acemanana de aloe purificado, extractos de hongos, beta-glucanos y extractos de la raíz del ginseng norteamericano (*Panax quinquefolium*) que contiene poli-furanosil-piranosil-sacáridos (CV Technologies Inc., Edmonton). Beta-glucanos incluyen los derivados de *Saccharomyces cerevisiae* (ImmunDyne, Inc., Florence, Kentucky). Otros extractos fungales útiles que contienen glucanos ramificados se derivan de hongos, tales como el hongo maitake (*Grifola frondosa*).

La invención provee además composiciones, por ejemplo, una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la combinación de DIM o de un indol asociado con el DIM, y un compuesto antiprotozoario o una combinación de compuestos antiprotozoarios. En realizaciones particulares, las composiciones son formuladas para administración oral, sublingual, rectal, vaginal, parenteral y tópica. En otra realización particular, las diferentes formulaciones son combinadas para formar un *kit* que combina supositorios rectales con una

suspensión oral para uso pediátrico, o supositorios rectales o vaginales con cápsulas o tabletas para uso en adultos.

La presente invención también provee composiciones para el tratamiento de infecciones protozoarias que comprenden DIM, un indol asociado con el DIM o DIM en combinación con compuestos antiprotozoarios seleccionados conocidos, en una cantidad efectiva para reducir conteos de parásitos en l sangre, tejido o intestino, formulados en forma de un suplemento dietético, por ejemplo, una tableta nutracéutica, cápsula, mezcla de bebida o alimento fortificado; una mezcla de te o una goma de mascar.

En los métodos y composiciones de la invención, DIM o un indol asociado con el DIM es procesado preferiblemente para aumentar la biodisponibilidad y/o es microencapsulado con fosfotidilcolina (PC), complejada con PC, o hecha en micropartículas y nanopartículas que se disuelven rápidamente. Preferiblemente, las formulaciones incluyen vehículos especializados para administración rectal o vaginal y ser seguras para uso durante el embarazo.

4. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a Diindolilmetano e indoles asociados con DIM útiles para el tratamiento y prevención o para reducir el riesgo de enfermedades protozoarias en mamíferos y aves. En particular, la invención se refiere al tratamiento y prevención de las enfermedades protozoarias en mamíferos y aves que figuran en la Tabla 1. En algunas realizaciones, el indol asociado con el DIM se usa en combinación con uno o más de lo siguiente: un agente antiprotozoario, un agente de diferenciación, un agente potenciador inmune y una vacuna antiprotozoaria. La presente invención se dirige a composiciones que comprende un indol asociado con el DIM, bien sea solo o en combinación con uno o más agentes antiprotozoarios adicionales. Los compuestos y métodos de la presente invención pueden usarse para el tratamiento y control de infecciones causadas por los parásitos protozoarios primarios que afectan al hombre, incluidos mas no limitados a hemoflagelados de la familia Trypanosomatida causante de Leishmaniasis, Tripanosomiasis y Bebesiosis, flagelados de la clase *Axostylata* causante de la infección Trichomonal, y parásitos del filo *Sporozoa*, *Apicomplexa*, causantes de malaria, toxoplasmosis y criptosporidiosis. Cubiertos también por los métodos está el tratamiento de infecciones por hongos del gen *Candida*, en particular *C. albicans*, que se comportan como protozoarios intracelulares que invaden las células epiteliales. En mamíferos no humanos, la enfermedad parasitaria protozoaria relacionada funcionalmente a malaria incluye enfermedad de ...

34

Neospora. Se sabe que las infecciones de *Neospora* se presentan en perros, ganado, ovejas, cabras y caballos. Tratable también según los métodos y composiciones de la presente invención está la infección con la especie de *Coccidea*, también del filo *Apicomplexa*, que infecta a humanos, animales domésticos y de granja, incluidas, aves, corderos, terneros, lechones y conejos.

Sin comprometernos con ninguna teoría, se cree que los compuestos y métodos de la presente invención inducen la apoptosis, por ejemplo, para inhibir las señales de supervivencia celular en células anfitrionas cuando dichas señales sean una respuesta de una infección parasitaria protozoaria que ayuda a la inducción de inmunidad del huésped, especialmente cuando se usan junto con vacunas antiprotozoarias. Se cree que la promoción de la apoptosis más eficiente y la interacción de antígenos protozoarios con células inmunes anfitrionas resulta del uso combinado de indol asociado con el DIM con una variedad de agentes antiprotozoarios, especialmente vacunas antiprotozoarias.

La infección protozoaria de células inicia los mecanismos de crecimiento celular y supervivencia celular atribuidos en forma única a la interacción de parásitos protozoarios con mecanismos apoptóticos de células anfitrionas (Heussler *et al.*, 2001, *Int J Parasitol.* 31:1166-76). Al entrar a las células, los parásitos protozoarios proveen una señal de activación para supervivencia celular, incluida la activación de señales NF-kB que inhibe la apoptosis celular (Aspira, 2004, *J. Parasitol.* 34(3):393-400). En infecciones parasitarias protozoarias, los parásitos protozoarios utilizan una variedad de estrategias para evitar la interacción con el sistema inmune anfitrión, incluso la diferenciación a formas menos activadoras, inhibición de proteínas de estrés pro-apoptico e inhibición de la exhibición del antígeno activador inmune en la superficie de las membranas de la célula anfitriona. Los indoles asociados con DIM provocan señales pro-apopticas a través del estrés del retículo endoplásmico el cual ha demostrado induce apoptosis en células cancerígenas (Sun *et al.*, 2004, *Cell Stress Chaperones.* 9(1):76-87).

Sin someternos a ninguna teoría, la presente invención emplea indoles asociados con DIM solos y juntos con agentes antiprotozoarios adicionales para inhibir el parásito protozoario asociado con la activación de NF-kB e inducir de manera selectiva la apoptosis en células infectadas por parásitos, reduciendo con ello la producción de la progenie protozoaria, reduciendo la carga parasitaria y resolviendo o acortando el periodo de la infección. Los usos profilácticos de indoles asociados con DIM solos o con agentes antiprotozoarios pueden prevenir la infección primaria o la reinfección con parásitos protozoarios. La inhibición selectiva de supervivencia sobreactiva y señales de crecimiento en células

infectadas con parásitos protozoarios en la presente invención pueden proveer terapia efectiva haciendo que se eliminen las células alteradas por los protozoarios mediante la provocación de la muerte celular programada (apoptosis). Lo que es más importante, la promoción de apoptosis en células infectadas por protozoarios pueden estimular una respuesta inmune más efectiva, resaltando la inmunidad natural y aumentando los beneficios a corto y largo plazo de vacunas antiprotozoarias co-administradas (James, 2005, *J Infect Dis.* 191(10):1573-5).

En ciertas realizaciones, estos métodos de la presente invención emplean compuestos sustituidos de diindolilmetano, asociados estructuralmente y derivados sintéticamente, administrados por vía oral, parenteral, vaginal o rectal. En una realización en particular, se provee una combinación de DIM o un indol asociado con el DIM y uno o más agentes antiprotozoarios conocidos. Los métodos y las composiciones proveen un tratamiento mejorado para infecciones de parásitos protozoarios.

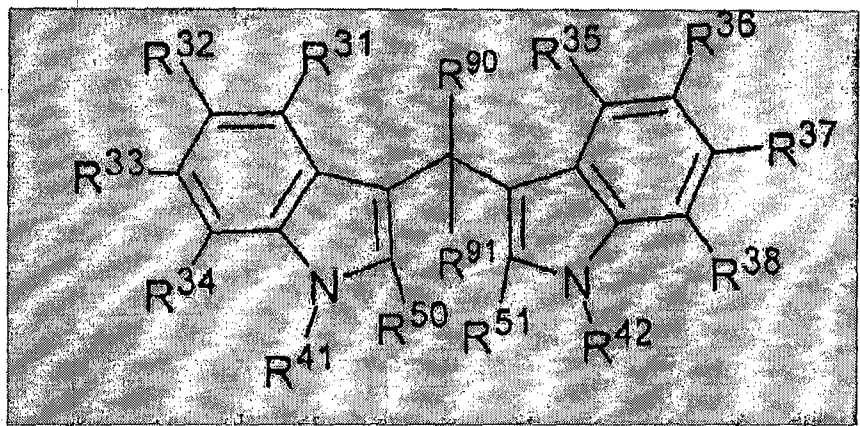
La invención se basa en parte en actividad esperada aditiva y sinérgica en el uso de combinaciones particulares de indoles asociados con DIM y agentes protozoarios para inducir apoptosis de manera selectiva en células infectadas protozoarias y muerte celular como apoptosis en parásitos extracelulares. Se cree que el uso combinado con indol asociado con el DIM permite el uso de una dosis más baja de ante(s) antiprotozoario(s), reduciendo de este modo los efectos secundarios causados por estos fármacos. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención pueden usarse con agentes estimulantes de diferenciación tales como derivados de Vitamina D (calcitrol [1-alpha-25-dihidroxicolecalciferol, derivados retinoides (Vitamina A, isotretinoína, retinoides) factores estimulantes de colonias de macrófagos (Filgrastim y Sargramostim) y otros agentes potenciadores inmunes. Se cree que la combinación de un indol asociado con el DIM y agentes antiprotozoarios induce la promoción de la apoptosis lo cual resulta en la eliminación selectiva de células infectadas por protozoarios y causa la resolución de lesiones de tejidos infectados asociadas con parásitos protozoarios, en particular, los intestinos, hígado, piel, corazón, bazo y sangre.

4.1 Indoles asociados con Diindolilmetano

Los indoles asociados con DIM o compuestos DIM útiles en los métodos y composiciones de la invención incluyen DIM (3,3'-diindolilmetano) y el trímero DIM lineal asociado (2-(indol-3-ilmetil)-3,3'-diindolilmetano [que se escribe también: 2(Indol-3-ilmetil)-indol-3-il]indol-3-ilmetano_ (LTR) e Indol-3-Carbinol (IC). Tal como se usa en este contexto, un "compuesto asociado de DIM" es

"indol asociado con el DIM" y un "derivado de DIM" se usan de manera intercambiable, y se refieren tanto a metabolitos naturales como análogos de DIM y también a "compuestos sustituidos de diindolilmetano, derivados sintéticamente y estructuralmente asociados" y "derivados sintéticos de DIM" como los que se describen aquí y en la técnica conocida. Tal como se utilizan aquí, "indoles asociados con crucíferos" abarcan los términos "compuesto asociado del DIM", "indol asociado con el DIM" y "derivado del DIM". Una persona versada en la técnica reconocerá que en cualquiera de las composiciones farmacéuticas o métodos de la invención donde se use un DIM, se puede usar un compuesto asociado de DIM, incluido un compuesto sustituido de diindolilmetano, derivado sintéticamente y estructuralmente asociado o un derivado sintético de DIM.

La estructura química de un DIM es la siguiente (donde cada uno de los grupos R es H):



(I)

En realizaciones particulares, el indol asociado con el DIM es un compuesto de la fórmula I, donde R^{42} , R^{51} , R^{35} , R^{36} , R^{37} , R^{38} , R^{90} , R^{41} , R^{50} , R^{31} , R^{32} , R^{33} , R^{34} y R^{91} , individual e independientemente, son hidrógenos o un sustituyente seleccionado del grupo compuesto por un halógeno, un hidroxil, un nitro, $-OR^{100}$, $-CN$, $-NR^{100}R^{101}$, $-NR^{100}R^{101}R^{102+}$, $-COR^{100}$, CF_3 , $-S(O)_nR^{100}(n=0-2)$, $-SO_2NR^{100}R^{101}$, $-CONR^{100}R^{101}$, $-NR^{100}COR^{101}$, $-NR^{100}C(O)NR^{101}R^{102}$, $-P(O)(OR^{100})_n(n=1-2)$, alquilo sustituido opcionalmente, halovinil, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroalquilo, heteroarilo, o cicloalquilo cicloalquenilo sustituido opcionalmente, todos de uno a diez carbonos y que contengan opcionalmente de 1-3 heteroátomos O o N, en donde R^{100} , R^{101} y R^{102} son alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroalquilo, heteroarilo sustituidos opcionalmente de uno a diez carbonos, y R^{90} y R^{91} pueden ser además O para crear una cetona. En realizaciones particulares, el compuesto incluye al menos un dicho sustituyente, preferiblemente en una posición diferente de, o en adición a R^{42} y R^{41} , el grupo alquilo o alcoxi lineal o ramificado es de uno

27
24

a cinco carbonos y/o el halógeno es seleccionado del grupo compuesto por cloro, yodo, bromo y flúor.

En ciertas realizaciones, se utiliza un metabolito hidroxilado o metoxilado activo de DIM, es decir, un compuesto de la fórmula I, en donde R^{32} , R^{33} , R^{36} y R^{37} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, hidroxilo y metoxi, y R^{31} , R^{34} , R^{35} , R^{38} , R^{41} , R^{42} , R^{50} y R^{51} son hidrógeno. En realizaciones particulares, el indol asociado con el DIM es un derivado DIM mono o di-hidroxilado en las posiciones de carbono 2, 4-7 y 2' y 4'-7', incluido cada uno de [2,4,5,6 ó 7]-monohidroxi-DIM o [2', 4', 5', 6' o 7']-monohidroxi-DIM (por ej: 2-hidroxi-DIM, 4-hidroxi-DIM, etc.); y cada uno de [2,4,5,6 ó 7], [2,4,5,6 ó 7]-dihidroxi-DIM, [2', 4', 5', 6' o 7'], [2', 4', 5', 6' o 7']-dihidroxi-DIM, o [2,4,5,6 ó 7], [2', 4', 5', 6' o 7']-dihidroxi-DIM (por ej: 2,4-dihidroxi-DIM, 2,5-dihidroxi-DIM, etc., 2,2'-dihidroxi-DIM, 2,4'-dihidroxi-DIM, etc); especies simétricas particularmente bilateralmente, tal como 2,2'-dihidroxi-DIM.

En realizaciones particulares, los medios indolilo son sustituidos simétricamente, en donde cada medio es similarmente mono-, di-, para-, etc. sustituido. En otras realizaciones particulares, R^{42} , R^{51} , R^{35} , R^{36} , R^{37} , R^{38} , R^{90} , R^{41} , R^{50} , R^{31} , R^{32} , R^{33} , R^{34} y R^{91} son hidrógeno, y R^{36} y R^{32} son un halógeno seleccionado de grupo compuesto por cloro, yodo, bromo y flúor. Compuestos representativos incluyen, mas no se limitan a: 3,3'-diindolilmetano, 5,5'-dicloro-diindolilmetano; 5,5'-dibromo-diindolilmetano; y 5,5'-difluoro-diindolilmetano. Derivados DIM adicionales así preferidos incluyen compuestos, en donde R^{42} , R^{51} , R^{35} , R^{36} , R^{37} , R^{38} , R^{90} , R^{41} , R^{50} , R^{31} , R^{32} , R^{33} , R^{34} y R^{91} son hidrógeno y R^{36} y R^{32} son un alquilo o alcoxi que tienen de uno a diez carbonos, y más preferiblemente de uno a cinco carbonos. Compuestos representativos incluyen, más no se limitan a: 5,5'-dimetil-diindolilmetano, 5,5'-dietil-diindolilmetano, 5,5'-dipropil-diindolilmetano, 5,5'-dibutil-diindolilmetano, 5,5'-dipentil-diindolilmetano, 5,5'-dimetoxi-diindolilmetano, 5,5'-dietoxi-diindolilmetano, 5,5'-dipropiloxi-diindolilmetano, 5,5'-dibutiloxi-diindolilmetano y 5,5'-diamiloxi-diindolilmetano.

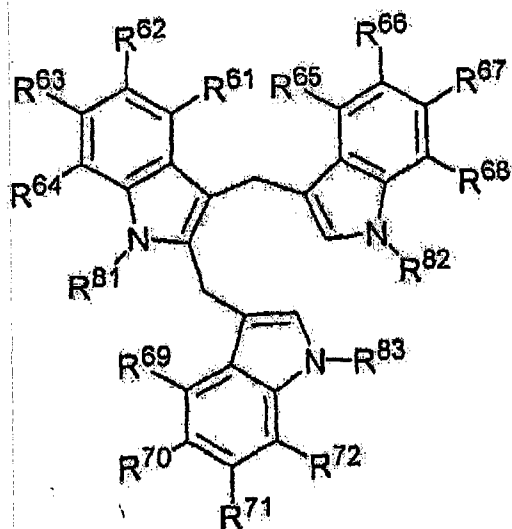
Derivados DIM adicionales preferidos incluyen compuestos en donde R^{51} , R^{35} , R^{36} , R^{37} , R^{38} , R^{90} , R^{50} , R^{31} , R^{32} , R^{33} , R^{34} y R^{91} son hidrógeno, y R^{42} y R^{41} son un alquilo o alcoxi que tiene de uno a diez carbonos y más preferiblemente de uno a cinco carbonos. Compuestos representativos incluyen, mas no se limitan a: N,N'-dimetil-diindolilmetano, N,N'-dietil-diindolilmetano, N,N'-dipropil-diindolilmetano, N,N'-dibutil-diindolilmetano y N,N'-dipentil-diindolilmetano. Aún en otra realización, R^{42} , R^{35} , R^{36} , R^{37} , R^{38} , R^{90} , R^{41} , R^{31} , R^{32} , R^{33} , R^{34} y R^{91} son hidrógeno y R^{51} y R^{50} son alquilo de uno a diez carbonos. y más preferiblemente

de uno a cinco carbonos. Compuestos representativos incluyen, más no se limita a; 2,2'-dimetil-diindolilmetano, 2,2'-dietil-diindolilmetano, 2,2'-dipropil-diindolilmetano, 2,2'-dibutil-diindolilmetano y 2,2'-dipentil-diindolilmetano. En otra realización, R^{42} , R^{51} , R^{35} , R^{36} , R^{37} , R^{38} , R^{90} , R^{41} , R^{50} , R^{31} , R^{32} , R^{33} , R^{34} y R^{91} son hidrógeno y R^{36} y R^{32} son nitro.

En una realización alternativa, se utilizan los derivados DIM activos con los sustituyentes R_{32} y R_{36} hechos de grupos etoxycarbonilo y R_{50} , R_{51} son hidrógeno o metilo.

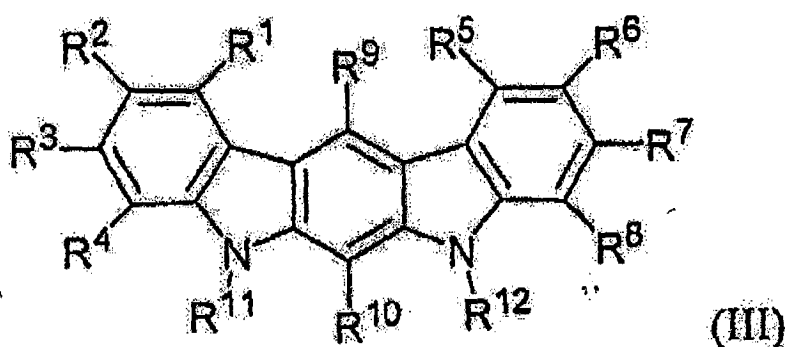
En otra realización, en esta invención se utilizan derivados DIM activos sustituidos incluidos compuestos metilados y clorinados, ejemplificados por aquellos que incluyen: 5,5'-dimetilDIM (5-Me-DIM), 2,2'-dimetilDIM (2-Me-DIM), y 5,5'-dicloroDIM (5-Cl-DIM) se describen en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 200220115708 por Safe, publicada el 22 de agosto de 2002 y que se incorpora en esta descripción por referencia. En otra realización, se utilizan derivados DIM activos sustituidos incluyen imidazolelil-3,3'-diindolilmetano, incluidos imidazolelil-3-'-diindolilmetanos sustituidos con nitro y compuestos adicionales asociados con DIM descritos en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2004/0043965 por Jon, Ling, publicada el 4 de marzo de 2004 y que se incorpora en esta descripción por referencia. En otra realización, se utilizan los derivados DIM activos que describe la Patente US # 6,656,963, Patente US # 6,369,095 y la Publicación de Solicitud de Patente US No. 20060229355 por Bjeldanes *et al*, publicada el 12 de octubre de 2006, las cuales se incorporan en esta descripción por referencia.

La estructura química de LTR es la siguiente (en donde cada uno de los grupos R es H):



En ciertas realizaciones, se utiliza un metabolito hidroxilado o metoxilado activo de LTR, es decir, un compuesto de la fórmula II, en donde R^{62} , R^{63} , R^{66} , R^{67} , R^{70} y R^{71} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, hidroxilo y metoxi y R^{61} , R^{64} , R^{65} , R^{68} , R^{72} , R^{81} , R^{82} y R^{83} son hidrógeno.

En ciertas realizaciones, un compuesto asociado con DIN tiene la fórmula (III):



en donde:

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 y R^{10} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C_1 - C_4 , alqueno C_2 - C_{24} , alquino C_2 - C_{24} , arilo C_5 - C_{20} , alcarilo C_6 - C_{24} , aralquilo C_6 - C_{24} , halo, hidroxilo, sulfhidrilo, alcoxi C_1 - C_{24} , alquenoilo C_2 - C_{24} , alquinoilo C_2 - C_{24} , arilo C_5 - C_{20} , acilo, acilo C_5 - C_{20} , alcoxycarbonilo C_2 - C_{24} , ariloxycarbonilo C_6 - C_{20} , halocarbonilo, alquylcarbonato C_2 - C_{24} , arilcarbonato C_6 - C_{20} , carboxi, carboxilato, carbamoilo, carbamoilo C_1 - C_{24} mono-sustituido, carbamoilo-(alquilo C_1 - C_{24})-di-sustituido, cianato, isocianato isotiocianato, azido, formilo, tioformilo, amino, amino(alquilo C_1 - C_{24}) mono y di-sustituido, amino(C_5 - C_{20}) mono y di-sustituido, alquylamido C_2 - C_{24} , arilamido C_6 - C_{20} , imino, alquylimino, arilimino, nitro, nitroso, sulfa, sulfonato, alquylsulfanil C_1 - C_{24} , arilsulfanil, alquylsulfinil C_1 - C_{24} , arilsulfinil C_5 - C_{20} , alquylsulfonil C_1 - C_{24} , arilsulfonil C_5 - C_{20} , fosfono, fosfonato, fosfinato, fosfo, fosfito y combinaciones de lo anterior, y además en donde cualquier dos sustituyentes (orto) adyacentes pueden estar enlazados para formar una estructura cíclica seleccionada de anillos de cinco miembros, anillos de seis miembros y anillos fusionados de cinco y/o seis miembros, en donde la estructura cíclica es aromática, alicíclica, heteroaromática o heteroalíclica y tiene de 0 a 4 sustituyentes de no hidrógeno y de 0 a 3 heteroátomos; y

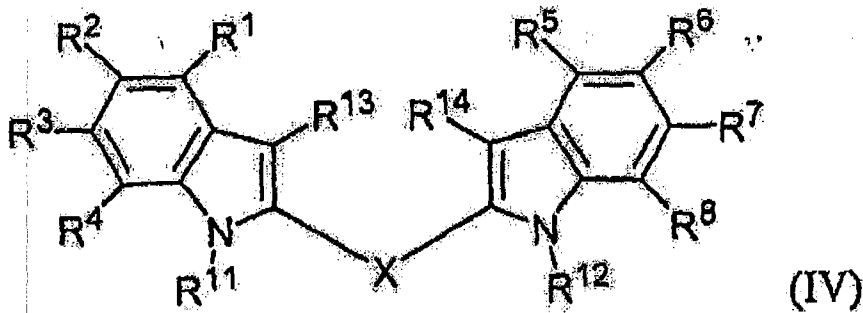
R^{11} y R^{12} son seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C_1 - C_4 , alqueno C_2 - C_{24} , alquino C_2 - C_{24} , arilo C_5 - C_{20} , alcarilo C_6 - C_{24} , aralquilo C_6 - C_{24} , halo, hidroxilo, sulfhidrilo, alcoxi C_1 - C_{24} , alquenoilo C_2 - C_{24} , alquinoilo C_2 - C_{24} , arilo C_5 - C_{20} , acilo, acilo C_5 - C_{20} , alcoxycarbonilo C_2 - C_{24} , ariloxycarbonilo C_6 - C_{20} , halocarbonilo, alquylcarbonato C_2 - C_{24} , arilcarbonato C_6 - C_{20} , carboxi, carboxilato, carbamoilo, carbamoilo C_1 - C_{24} mono-sustituido, carbamoilo-(alquilo C_1 - C_{24})-di-sustituido, cianato, isocianato isotiocianato, azido, formilo, tioformilo, amino, amino(alquilo C_1 - C_{24}) mono y di-sustituido, amino(C_5 - C_{20}) mono y di-sustituido, alquylamido C_2 - C_{24} , arilamido C_6 - C_{20} , imino, alquylimino, arilimino, nitro, nitroso, sulfa, sulfonato, alquylsulfanil C_1 - C_{24} , arilsulfanil, alquylsulfinil C_1 - C_{24} , arilsulfinil C_5 - C_{20} , alquylsulfonil C_1 - C_{24} , arilsulfonil C_5 - C_{20} , fosfono, fosfonato, fosfinato, fosfo, fosfito y combinaciones de lo anterior, y además en donde cualquier dos sustituyentes (orto) adyacentes pueden estar enlazados para formar una estructura cíclica seleccionada de anillos de cinco miembros, anillos de seis miembros y anillos fusionados de cinco y/o seis miembros, en donde la estructura cíclica es aromática, alicíclica, heteroaromática o heteroalíclica y tiene de 0 a 4 sustituyentes de no hidrógeno y de 0 a 3 heteroátomos; y

alquilo C₁-C₂₄ alquilamino C₁-C₂₄) sustituido y alquilo C₁-C₂₄ di-(alquilo C₁-C₂₄) amino sustituido.

con las condiciones que; al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ y R¹² es diferente de hidrógeno; y cuando R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son seleccionados de hidrógeno, halo, alquilo y alcoxi, entonces R¹¹ y R¹² son diferentes de hidrógeno y alquilo.

Una realización preferida incluye el uso de 2,10-dicarbetoxi-6-metoxi-5,7-dihidro-indolo-[2,3-b]carbazol (SRI13668 (SRI Inc., Menlo Park, CAA)). Realizaciones preferidas adicionales incluyen el uso de 6-etoxicarbonilo-5,7-dihidro-indolo-[2,3-b]carbazol (SRI inc., Menlo Park, CA).

En otra realización, un compuesto asociado de DIM tiene la fórmula (IV):



en donde

R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C₁-C₂₄, alqueno C₂-C₂₄, alquino C₂-C₂₄, arilo C₅-C₂₀, alcarilo C₆-C₂₄, aralquilo C₆-C₂₄, halo, hidroxilo, sulfhidrilo, alcoxi C₁-C₂₄, alquenilo C₂-C₂₄, alquino C₂-C₂₄, arilo C₅-C₂₀, acilo, acilo, alcoxycarbonilo C₂-C₂₄, halocarbonilo, alquilcarbonato C₂-C₂₄, arilcarbonato C₆-C₂₀, carboxi, carboxilato, carbamoilo, carbamoilo (alquilo C₁-C₂₄) mono sustituido, carbamoilo (alquilo C₁-C₂₄) di-sustituido, carbamoilo, arilcarbamoilo mono sustituido, tiocarbamoilo, carbamido, ciano, isociano, cianato, isocianato, isotiocianato, azido, formilo, tioformilo, amino, amino (alquilo C₁-C₂₄) mono y di sustituido, amino (arilo C₅-C₂₀) disustituido, alquilamido C₂-C₂₄, arilamido C₅-C₂₀, imino, alquilimino, arilimino, nitro, nitroso, sulfa, sulfonato, alquilsulfanilo C₁-C₂₄, arilsulfanilo, alquilsulfinilo C₁-C₂₄, arilsulfinilo C₅-C₂₀, alquilsulfonilo C₁-C₂₄, arilsulfonilo C₅-C₂₀, fosfono, fosfonato, fosfinato, fosfo, fosfito y combinaciones de lo anterior, y además en donde dos (o) sustituyentes adyacentes pueden estar enlazados para formar una estructura cíclica seleccionada de anillos de cinco miembros, anillos de seis miembros y anillos fusionados de cinco y/o seis miembros, en donde la estructura cíclica es aromática, alicíclica, heteroaromática

31
30

heteroátomos, con la condición de que uno pero no ambos de R^2 y R^6 sea amino, amino mono-sustituido o amino di-sustituido;

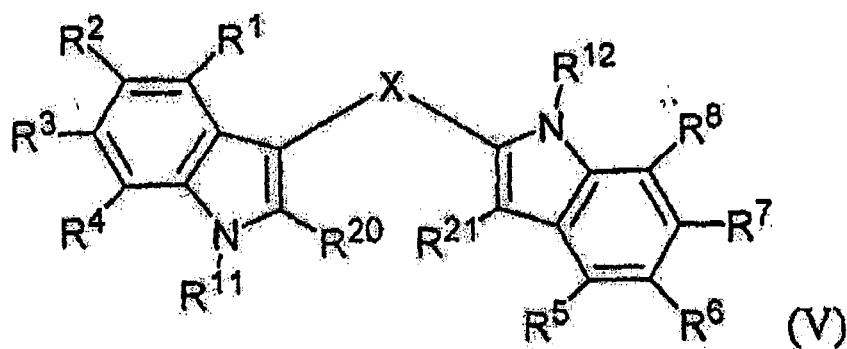
R^{11} y R^{12} son seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C_1-C_{24} , alcoxicarbonilo C_2-C_{24} , alquilo C_1-C_{24} amino sustituido, alquilo C_1-C_{24} -(alquilamino C_1-C_{24})-sustituido, y alquilo C_1-C_{24} di(C_1-C_{24})amino sustituido;

R^{13} y R^{14} se definen como para R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 y R^8 , con la condición de que al menos uno de R^{13} y R^{14} sea diferente a hidrógeno; y

X es O, S, amileno, heteroarileno, $CR^{15}R^{16}$ o NR^{17} , en donde R^{15} y R^{16} son hidrógeno, alquilo C_1-C_6 , o juntos forman $=CR^{18}R^{19}$, donde R^{18} y R^{19} son hidrógeno o alquilo C_1-C_6 , y R^{17} es según se define para R^{11} y R^{12} .

Una realización preferida incluye el uso de 2,6-dicarbetoxy-3,3'-dimetil-13,14-diindolilmetano (SRI Inc., Menlo Park, CA).

En otra realización, un compuesto asociado a DIM tiene la fórmula (V):



en donde

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^{11} , R^{12} y X se definen como los compuestos de la fórmula (III); y

R^{20} y R^{21} se definen como para, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 y R^8

aún en otra realización, el indol asociado con el DIM es un derivado tetramérico de indol-3-carbinol (Brandi et al., 2003 *Cancer Res.* 63:4028-4036). En otra realización, el indol asociado con el DIM es un derivado de indol-e-carbinol descrito como un agente antitumoral (Weng JR, Tsai CH, Kulp SK, Wang D, Lin CH, Yang HC, Ma Y, Sargeant A, Chiu CF, Tsai MH Chen CS. Un potente agente antitumoral derivado de indol-3-carbinol con efectos pleyotrópicos en trayectos de señales múltiples en células cancerígenas de la próstata. *Cancer Res.* 2007 Ago 15;67(16):7815-24).

Análogos DIM sustituidos son preparados rápidamente por condensación de formaldehído con indoles sustituido disponibles en el comercio. Los compuestos precursores pueden sintetizarse por condensación de dimetilformamida de un indol sustituido adecuado para formar un indol-3-aldehído sustituido. Indoles sustituidos adecuados incluyen indoles que tienen sustituyentes en las posiciones R⁴², R⁵¹, R³⁵, R³⁶, R³⁷ y R³⁸. Estos incluyen, mas no se limitan a indoles 5-metoxi, 5-cloro, 5-bromo, 5-fluoro, 5'-metil, 5-nitro, n-metil y 2-metil. El producto indol-3-aldehído sustituido es tratado con un alcohol adecuado como metanol y con borohidruro sódico sólido para reducir el medio aldehído para dar I3C sustituidos. Los DIM sustituidos se preparan mediante la condensación de los productos indol-e-carbinol sustituidos. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante tratamiento con un tamponador de fosfato que tenga un pH de aproximadamente 5.5 – 7.4

4.2 Terapia de combinación

En ciertas realizaciones de la invención, se puede usar un indol asociado con el DIM en combinación con uno o más de lo siguiente: un agente antiprotozoario, un agente de diferenciación, un agente potenciador inmune o una vacuna antiprotozoaria. Se entiende que se puede usar más de un agente de cada clase, por ejemplo, múltiples agentes antiprotozoarios.

Combinaciones de fármacos especialmente preferidas para se usadas junto con indoles asociados a DIM adicionales según la presente invención incluyen las combinaciones sin artemisinina, quinina y sulfadoxina-pirimetamina y quinina doxiciclina. Los tratamientos de combinación basados en artemisinina para usarse con indoles asociados a DIM incluyen: Arteméter-lumefantina, artesunato y amodiaquina, dihidroartemisina y piperquina, artesunato y mefloquina, artesunato y sulfadoxina-pirimetamina y dihidroartemisina-naftoquina-trimetoprim. Para infecciones critosporidiales con indoles asociados a DIM, combinaciones preferidas son artemisinina y curcumina o genisteina. Para infecciones tricomonales, se usa un indol asociado con el DIM con artesunato, metronidazol, tinidazol o hexadecilfosfocolina (miltefosina). Para infecciones Candidales (candidiasis) se usa un indol asociado con el DIM con un derivado de azol, en particular un compuesto imidizol como clotrimizol, miconazol, o butoconazol. Para vaginitis bacteriana combinada y Tricomonas, se usa un indol asociado con el DIM en combinación con clindamicin, o con clindamicin y artesunato. Alternativamente, una infección con multiorganismos puede tratarse con un indol asociado con el DIM combinado con metronidazol, o con metrodidazol y artesunato.

4.2.1 Agentes antiprotozoarios

Los agentes antiprotozoarios que pueden combinarse con los indoles asociados a DIM según la presente invención incluyen fármacos antiprotozoarios establecidos, fármacos antiprotozoarios derivados de productos naturales, fármacos que inducen la apoptosis frecuentemente con una historia de uso como productos quimioterapéuticos que inducen la apoptosis y productos naturales antiprotozoarios conocidos. Tal como se utiliza en este contexto, un "agente antiprotozoario" no incluye un indol asociado con el DIM (el cual tiene actividad antiprotozoaria). En otras palabras, la referencia a la combinación de un indol asociado con el DIM y un agente antiprotozoario, el "agente antiprotozoario" es un agente diferente a un indol asociado con el DIM.

Agentes antiprotozoarios incluyen, mas no se limitan a: atovacuona, diaminopirimidinas, especialmente amodiaquina, anfotericina, butoconazol, astemizol clindamicin, eflornitina, fumagilina; las 8-hidroxiquinolinas, yodoquino (diiodohidroxiquin), clioquinol (yodoclorhidroxiquin), los 2-nitroimidazoles, Etanidazol, Benznidazol fluoroquinolonas, enoxacin, ciprofloxacina; doxiciclina, melarsoprol, metronidazol, tinidazol, miltefosina, nifurtimox, nitazoxanida, paromomicina, pentamindina, estibogluconato sódico, gluconato de antimonio (SAG) y antimonios asociados, suramina, incluida la sal de sodio, tinidazol, pirimetamina, proguanil (cloroguanida), espiramicina y sulfadoxina. También son útiles espermácidas detergentes y no detergentes que tengan actividad antiprotozoaria adicional cuando se usan en formulaciones tópicas (Gupta G. *Microbicidal spermicide o spermicidal microbicide? Eur J Contracept Reprod Health Care. Dic 2005; 10(4):212-8*).

Fármacos antiprotozoarios derivados de productos naturales incluyen, mas no se limitan a: lactosas de sesquiterpeno asociadas a artemisinina de *Artemisia annua*, en particular artemisinina, dihidroartemisinina, arteméter, artesunato y otros derivados de artemisinina descritos en literatura (Haynes, 2006, *From artemisinin to new artemisinin antimalarials: biosynthesis, extraction, old and new derivatives, stereochemistry and medicinal chemistry requirements. Curr Top Med Chem. 6(5):509-37*); quinolinas como quinina derivada de la corteza del árbol chinchona de Sur América, incluidos alcaloides asociados estructuralmente con quinina, quinina y quinolinas asociadas con quinina, halofantrina, mefloquina, lumefantrina, amodiaquina, pironaridina, piperaquina, cloroquina, hidroxicloroquina, naftoquina, primaquina, tafenoquina, amodiaquina y 4-aminoquinolinas derivadas de las quinolinas (Nelly *et al.*, 2006, *Curr Top Med Chem*).

Revista de Salud Pública

en particular salvicina y sus derivados (Qing C. *et al.*, *In Vitro cytotoxicity of a salvicine, a novel diterpenoid quinone*, Zhongguo Yao Li Xue Bao. Abr. 1999; 20(4):297-302); curcuminoides derivados de curcumina, extraídos de *Curcuma domestica*, incluidos 6-gingerol y 6-paradol (Surh *et al.*, 1999, *J. Environ Pathol Toxicol Oncol.* 18:131-9); flavonoides e isoflavonas seleccionados, incluidos mas no limitados a: Genisterin de soya y derivados de un número de fuentes de plantas incluidos dehidrosilibin, silibin A y silibin B e isosilibin A e isosilibin B, y 8-(1;1)-DMA-kaempferida (Tasdemir *et al.*, 2006, *Antimicrob Agents Chemother.* 50:1352-64), luteolina, baicaleina, ácido dihidrobetulínico, quercetina, ácido eriodictiol, ácido lursólico, ácido oleanólico; y triterpenos, en particular ácido Ganodérico X, aislado de *Ganoderma amboinense* y extractos ricos en triterpeno de *Sapindus mukorossi* que se sabe tienen actividad anti-tricomonal.

Agentes antiprotozoarios que inducen la apoptosis incluyen, mas no se limitan a: derivados de artemisinina, atovacuona, cloroquina, yodoquinol (diiodohidroxiquina), clioquinol (yodoclorhidroxiquina), ácido Jasmónico [3-oxo-2-(2-pentenil)ácido ciclopentanacético], metil jasmonato [metil 3-oxo-2-(pentenil)ácido ciclopentanacético], y *cis*-jasmon [3-metil-2-(2-pentil)-2-ciclopenten-1-ona], 3,3'-yoduro de dihexiloxacarbocianina, estibogluconato sódico, extractos de *Yucca schidifera* y curcumina. Productos quimioterapéuticos que inducen la apoptosis incluyen, mas no se limitan a: Pirroloquinazolidinamina, Novobiocina, quercetina, ciclosporina, ácido dihidrobetulínico, campotectinas, especialmente topotecan, irinotecan, SN38 (el metabolito activo de irinotecan), bortezomib, etoposida, quinonas incluidos salvicina y antraciclinas, incluidos doxorubicin, daunorubicin, 4'-epirubicin, idarubicin y deoxidoxorubicin.

Productos naturales antiprotozoarios incluyen, mas no se limitan a té y extractos hechos de *Artemisa annua*, té y extractos hechos de *Curcuma domestica*, extractos de ajo que incluyen alicina y otros tiosulfatos, extractos de raíz de *Uvaria chamae* (Annonaceae) y *Hipocratea Aricana* (Hippocrateaceae) y extractos de raíz de *Homalim leteslui*. También son útiles extractos de plantas del Brasil que demostraron actividad antimalárica, incluidas *Vernonia brasiliensis* y *Acanthospermum australe* (Carvalho, 191, *Braz J. Med Biol Res.* (24(11); 1113-23 y Botsaris AS. *Plants used traditionally to treat malaria in Brazil; the archives of Flora Medicinal. J. Ethnobiol Ethnomed.* Mayo 2007 1;2:18).

Agentes preferidos para uso combinador con indoles asociados a DIM incluyen extractos de artemisinina y fármacos asociados, curcumin y fármacos asociados con curcumin y otros agentes antiprotozoarios con medias vidas metabólicas cortas, preferiblemente con una media vida similar a DIM (es decir,

54

aproximadamente de 2-7 horas). Cuando se usan con indoles asociados con el DIM, los antimaláricos preferidos desaparecerán metabólicamente dentro de las 12 horas siguientes a la dosis oral y no aumentan la actividad de enzimas de citocromo que metabolizan el fármaco (Giao *et al.*, 2001, *Clin Pharmacokinet.* 40(5):343-73). La literatura describe otras preparaciones útiles de productos naturales (Willcox *et al.*, 2004, *BMJ.* 329(7475):1156-9).

4.2.2 Agentes estimulantes de diferenciación

En una realización adicional, se administra la combinación de un indol asociado con el DIM y un agente antiprotozoario junto con agentes estimulantes de diferenciación que ayudan a que las células infectadas con protozoarios se desarrollen en células diferenciadas completamente y más terapéuticamente sensibles. Los agentes estimulantes de diferenciación incluyen Vitamina D, derivados de Vitamina D, Vitamina A (retinoides), derivados retinoides y factores estimulantes de la colonia de granulocitos/macrófagos incluidos Filgrastim y Sargramostim humano recombinante.

4.2.3 Agentes potenciadores inmunes

Los indoles asociados con el DIM también pueden usarse en combinación con agentes potenciadores inmunes de indol no asociado con el DIM. Los agentes potenciadores inmunes útiles en los métodos de la presente invención incluyen extractos de Aloe vera, extractos de hongos, beta-glucanos y extractos de la raíz del ginseng norteamericano (*Panax quinquefolium*) que contiene poli-furanosil-piranosil-sacáridos (CV Technologies, Inc., Edmonton). Extractos útiles de *Panax quinquefolium* se describen en la Patente U.S. No. 6,083,932 de Pang *et al.*, la cual se incorpora en este contexto en su totalidad. Beta-glucanos incluye los derivados de *Saccharomyces cerevisiae* (En-Bio Technology Co., Ltd.). Otros extractos fungales útiles que contienen glucanos ramificados se derivan de hongos, tales como el hongo maitake (*Grifola frondosa*). Se ha descrito el uso oral de beta-glucanos en infecciones (Jung *et al.*, 2004, *J Vet Med B Infec Dis Vet Public Health.* 51(2):72-6).

4.2.4 Vacunas antiprotozoarias

Las vacunas actuales no inducen suficiente inmunidad protectora para eliminar una infección existente y prevenir que se repita la infección. Por lo tanto, en un aspecto de la invención, un indol asociado con el DIM es administrado con una vacuna para mejorar la respuesta a la vacuna, es decir, induciendo una mayor respuesta por medio de la inducción de la apoptosis.

En una realización, un indol asociado con el DIM, opcionalmente con un agente antiprotozoario, es administrado junto con una vacuna antiprotozoaria, por ejemplo, una vacuna que contenga organismos protozoarios atenuados, típicamente inactivados por irradiación y/o procesamiento químico. Se cree que la inducción de apoptosis más eficiente de células anfitrionas infectadas con protozoarios atenuados y la interacción más efectiva de antígenos protozoarios con células inmunes anfitrionas resulta del uso combinado de indol asociado con el DIM con una variedad de vacuna.

4.3 Prevención y Tratamiento de Infecciones Parásitas Protozoarias

En ciertas realizaciones, la presente invención sirve para la prevención y tratamiento de infecciones parásitas protozoarias que incluyen infecciones activas e infecciones crónicas asintomáticas. Actualmente, a este espectro de infecciones parásitas protozoarias le falta una terapia adecuada y eficaz debido a la falla de los enfoques anteriores para eliminar de manera selectiva las células y tejidos infectados con parásitos protozoarios e identificar los trayectos de señales celulares anti-apópticas activadas por parásitos protozoarios. Idealmente, el uso de indoles asociados con el DIM permitirá tratamientos más seguros y efectivos de las infecciones protozoarias durante el embarazo en pacientes comprometidos inmunes. El tratamiento de las varias enfermedades parásitas protozoarias varía según el tipo de parásito y entorno del tratamiento.

4.3.1 Principios generales de Tratamiento para parásitos protozoarios con el uso de Indoles asociados con el DIM.

Los indoles asociados con el DIM se usan para el tratamiento y prevención de infecciones parásitas protozoarias en formulaciones más indicadas para la entidad de la enfermedad, severidad de la enfermedad y entorno del tratamiento. Un objeto de la invención es eliminar o reducir la necesidad de terapia parenteral de las enfermedades protozoarias, y al hacerlo, reducir la necesidad de hospitalización. Cuando sea indicado, DIM se usa en combinación con otros agente antiprotozoarios aconsejables para reducir las probabilidades de crear resistencia a la actividad del indol asociado con el DIM. Agentes protozoarios aconsejables para uso combinado poseen una o más de las siguientes características: seguridad, estabilidad, compatibilidad química en formulaciones, tolerabilidad, efectividad, forma de dosis oral o intravenosa, media vida de eliminación corta, modo independiente de acción, actividad sinérgica *in vivo*. Idealmente, los agentes para combinación serán económicos y permitirán una duración corta de uso con el fin de lograr una respuesta durable al tratamiento y

37

250

Importante también en usos y productos combinados está la compatibilidad con uso junto con vacunas antiprotzoarias, incluidas las que se puedan crear en el futuro. Agentes antiprotzoarios aconsejables para uso combinado incluyen compuestos que indoles asociados con el DIM apoyan la apoptosis selectiva de células infectadas con parásitos. Ejemplos incluyen, mas no se limitan a: derivados de artemisinín, atovacuona, cloroquina, yodoquinol (diiodohidroxiquina), clioquinol (yodoclorhidroxiquina), miltefosina, estibogluconato sódico y curcumina.

También aconsejables para uso en combinación con indoles asociados con el DIM, con o sin vacunas, están los agentes antibióticos o quimioterapéuticos seleccionados que inducen a apoptosis, Agentes aconsejables inhiben la función proteosomal, inducen el estrés del retículo endoplásmico, inhiben las enzimas de topoisomerasa, inhiben H^+ -ATP vacuolar y/o inhiben las enzimas transferasa farnesil. Agentes quimioterapéuticos preferidos para uso en combinación con indoles asociados con DIM para parásitos protozoarios son: fluoroquinolonas, enoxacin, ciprofloxacín, Novobiocín, ciclosporina, luteolin, butoconazol, butirato sódico (butanoato sódico), fenilbutirato, curcumin, evodiamina, ácido dihidrobetulínico, campotectinas, especialmente topotecan, irinotecan, bortezomib, etoposida, quinonas, incluidas salvicina y las antraciclinas incluidos doxorubicin, daunorubicin, 4'-epirubicin, idarubicin y deoxidoxorubicin.

También se pueden escoger agentes antiprotzoarios aconsejables para combinación con indoles asociados con DIM como indicados para entornos de uso ambulatorio y rural. El propósito de este tipo de agentes es la distribución y uso como productos nutracéuticos sin prescripción o supervisión médica. Los ingredientes deben ser seguros, estables sin refrigeración y fáciles de usar. Idealmente, los productos nutracéuticos serán compatibles para uso junto con otros antiprotzoarios de productos naturales, en particular té hecho de *Artemisia Annua*, la fuente de artemisinina. Evodiamina, un componente alcaloide indol extraído de la fruta de *Evodiae Fuctus* (*Evodia rutaecarpa* Benth.) es un producto natural alternativo para uso con indoles asociados con DIM. La literatura describe medicinas herbales adicionales compatibles con indol asociado con DIM y el su uso correcto (Willcox *et al.*, 2004, BMJ 329(7475):1156-9).

Los regímenes de dosis y tratamiento de los agentes antimaláricos se describen en *The Pharmacologic Basis of Therapeutics*, de Goodman & Gilman, Goodman *et al.*, [ed], 9 edición (15 de enero de 1996), McGraw Hill Text.

4.3.2 Uso de indoles asociados con DIM con agentes antiprotozoarios contra la malaria

4.3.2.1 Malaria Severa

En infección *Plasmodium falciparum* severa con características neurológicas, denominada malaria cerebral (MC), en particular alteración de la conciencia, el uso de indoles asociados con DIM se hace por medio de vía parenteral o supositorios rectales. El indol asociado con DIM intravenoso es administrado generalmente en rotación con quinina parenteral o un fármaco basado en artemisinina (como dihidroartemisinina, arteméter o artesunato). La tasa de administración intravenosa de indol asociado con DIM y agente(s) antimalárico(s) adicional(es) se basa en función renal, función hepática o estado general del paciente. Esto es en adición a fluidos parenterales, transfusión de sangre, diuréticos osmóticos y corrección de hipoglicemia, acidosis e hipovolemia. Se adiciona oxígeno por enmascaramiento o ventilación mecánica para potenciar la actividad antiparasítica del indol asociado con DIM y fármaco antiprotozoario adicional. La administración de la terapia con oxígeno se utiliza como apoyo de los mecanismos apópticos de acción de los indoles asociados con DIM.

4.3.2.2 Malaria Moderada a Severa

La malaria moderadamente severa se caracteriza normalmente por fiebre y letargo. En lo posible, se deben hacer pruebas de sangre de parasitemia para establecer el diagnóstico y repetirse para documentar el tiempo de eliminación de los parásitos (PCT). Según esta invención, el tratamiento comienza con indol asociado con DIM rectal, preferiblemente en un supositorio combinado con derivado de Artemisinina. Los pacientes que pueden tomar fluidos orales simultáneamente comienzan con una preparación oral de indol asociado con DIM en suspensión o en cápsulas o tabletas. A los sujetos que tengan un nivel reducido de conciencia se les administran fluidos de hidratación parenteral. Cuando esté disponible, se adiciona oxígeno en enmascarimiento para potenciar la actividad antiparasítica del indol asociado con DIM y un fármaco antiprotozoario adicional. Luego de 3 días se repite el examen de frotis sanguíneo para establecer el PCT. Generalmente, la terapia oral con indol asociado con DIM es administrada con un segundo fármaco antimalárico, preferiblemente artemisinina o derivado de artemisinina, en combinación con lumefantrina, mefloquina, sulfadoxina-pirimetamina, o amodiaquina en áreas resistentes a la cloriquina. Para uso en áreas sensibles a cloroquina, la terapia con indol asociado con DIM es administrada generalmente con artimisinina y/o cloroquina. La duración óptima del

tratamiento es de 3 a 14 días. El frotis sanguíneo para examen de paritemia se repite nuevamente a los 14 días y nuevamente a los 28 días.

4.3.2.3 Uso con vacunas antimaláricas

Luego de la administración de una vacuna malárica preventiva, típicamente una vacuna basada en esporozoitos, se inicia una terapia oral con indol asociado con DIM a las 24-96 horas luego de administrar la vacuna. óptimamente, la composición del indol asociado con DIM es administrada como una suspensión oral o tableta en combinación con uno o más fármacos antimaláricos seleccionados de derivados de artemisinina, primaquina, atovacuona, proguanil o pirimetamina-sulfadoxina.

4.3.2.4 Uso profiláctico por individuos no inmunes

En anticipación a la exposición a parásitos maláricos durante viaje o residencia en un área endémica, la terapia con indol asociado con DIM se inicia a la llegada, se continúa diariamente durante la exposición al riesgo y se continúa por 1-2 semanas luego del periodo de la exposición. Alternativamente, la terapia asociada con DIM se toma en combinación con fosfato de Cloroquina (Aralen) 500 mg una vez a la semana o en dosis pediátricas sugeridas comenzando una semana antes de la exposición y continuando hasta 2 semanas después de la exposición en áreas sensibles a la cloroquina. Alternativamente, en áreas resistentes a la cloroquina, la terapia oral con indol asociado con DIM se toma junto con Atovacuona-proguanil (Malarone) en dosis estándar, con Clorhidrato de Mefloquina (Lariam) en dosis estándar, con hiclato de Doxiciclina en dosis estándar, o con fosfato de Primaquina en dosis estándar. A opción del médico supervisor, la dosis de agentes que no contengan DIM puede reducirse durante el periodo de la profilaxis cuando se utilice la terapia con indol asociado con DIM. Preferiblemente, el indol asociado con DIM se combina en la misma tableta o cápsula con fosfato de primaquina. El indol asociado con DIM es combinado con un derivado de Artemisinina, y opcionalmente curcúmina adicional para uso durante el embarazo.

4.3.3 Uso combinado de indoles asociados con DIM con agentes antiprotozoarios para Tripanosomiasis

Para el tratamiento de *African tripanosomiasis* durante la etapa meningoencefalítica tardía, se alterna una suspensión o emulsión intravenosa de indol asociado con DIM con melarsoprol intravenoso. El propósito de este uso combinado es permitir una reducción de la dosis de melarsoprol de la típica de 20-36 mg/kg por día de melarsoprol para 3-4 días a la semana por 3 semanas

40
29
7

consecutivas. Alternativamente, dosis más bajas de melarsoprol de 1-2 mg/kg por día se administran con indol asociado con DIM intravenoso durante 10 días continuos. Para infección debida a *T. brucei gambiense*, se administra indol asociado con DIM intravenoso u oral junto con Pentamidina intramuscular o intravenosa en dosis estándar por un periodo de 10 días. Para infección debida a *T. brucei rhodensiense*, se usa indol asociado con DIM intravenoso u oral, junto con Suramin intravenoso en dosis estándar por un periodo de 10 días. Alternativamente, en casos severos de *African tripanosomiasis*, se administra indol asociado con DIM junto con un derivado de campotecin intravenoso tal como topotectan en dosis estándar durante 10 o más días.

Para el tratamiento de *American tripanosomiasis* (Enfermedad de Chaga) debida a *T. curzi*, se usa indol asociado con DIM intravenoso u oral junto con Suranim intravenoso en dosis estándar por un periodo de 10 días en caso de enfermedad severa. Alternativamente, se administra indol asociado con DIM oral junto con nifurtimox oral y/o bensusnidazol. Alternativamente, indol asociado con DIM es formulado con nifurtimox o bensusnidazol en la misma suspensión oral de sabor o píldora para mejorar el desempeño y facilidad de uso durante tratamiento crónico.

Alternativamente, se administra indol asociado con DIM intravenoso junto un derivado de campotectina intravenosa como topotectan en dosis estándar durante 10 o más días en casos severos de *American tripanosomiasis*.

4.3.4 Uso combinado de indoles asociados con DIM con agentes antiprotozoarios para Leishmaniasis

Para el tratamiento de Leishmaniasis, la terapia de indol asociado con DIM es combinada con la administración de compuestos de antimonio Pentavalente para una terapia más efectiva. Típicamente, indol asociado con DIM oral o intravenoso es administrado junto con estibogluconato sódico a una dosis de 20 mg/mg/día o menos por un periodo de 28 días para tratar leishmaniasis visceral. Alternativamente, indol asociado con DIM intravenoso es administrado junto con un derivado de campotectina intravenosa tal como topotectan en dosis estándar por 10 o más días en casos severos de leishmaniasis visceral. Para enfermedad cutánea, la duración del tratamiento combinado se reduce a 20 días. Opcionalmente, una preparación transdermal de indoles asociados con DIM es agregada al indol asociado con DIM administrado oralmente y la preparación es aplicada tópicamente sobre la lesión cutánea. Alternativamente, indol asociado con DIM intravenoso es administrado en combinación con anfotericina B liposomal

41
42

enfermedad cutánea. En lo posible, la terapia oral para la enfermedad cutánea consiste de indol asociado con DIM administrado con miltefosina oral. Esta combinación permite una reducción en la dosis estándar de miltefosina de 100 mg/kg/día. Adicionalmente, se puede administrar un indol asociado con DIM tanto oralmente como tópicamente para uso en combinación con paromomisin y/o gentamicina adicional.

En un enfoque alternativo, un indol asociado con DIM es administrado por vía oral o parenteral con miltefosina y/o con un derivado de artimesinina en una formulación veterinaria formulada como suplemento para perros u otros animales domésticos. Puede administrarse en programas regionales para reducir la transmisión de perros u otros animales domésticos que sirven como depositarios de los parásitos.

4.3.5 Uso de indoles asociados con DIM con agentes antiprotozoarios para Enfermedad diarreica protozoaria debida a *Cryptosporidia* u otros protozoarios *Coccidiales*

La terapia con indol asociado con DIM para diarrea Coccidal causada típicamente por *Cryptosporidium parvum*, *C. hominis*, o *Cyclospora cayetanensis* se basa en síntomas e identificación de los oocitos protozoarios en el análisis de heces. En adultos, los indoles asociados con DIM orales se emplean típicamente para tratamiento empleando un rango de dosis de 50-200 o 50-400 dos veces al día, sola o junto con Nitazoxanida 50 mg dos veces al día en adultos. En niños se usa indol asociado con DIM como una suspensión pediátrica que provee 25-150 o 25-300 mg dos veces al día, sola o junto con una suspensión de Nitazoxanida, 200 mg dos veces al día. Alternativamente, se pueden usar cápsulas que contengan una combinación de DIM, Artemisinina y curcumina dos veces al día con Nitazoxanida. Estas cápsulas también son útiles para el tratamiento de infecciones Microsporidiales causadas por las especies *Enterocytozoon* en pacientes inmunocomprometidos.

4.3.5.1 Uso de indoles asociados con DIM con agente antiprotozoarios para Toxoplasmosis

El tratamiento de encefalitis toxoplásmica consiste en la administración de indoles asociados con DIM orales en un rango de dosis de 50-200 o 50-300 mg dos veces al día, sola o junto con pirimetamina y sulfadiazina junto con ácido polínico utilizando protocolos establecidos en adultos. En niños se usa el indol asociado con DIM como una suspensión pediátrica que provee 25-150 o 25-300 mg dos veces al día, sola o junto con una suspensión de pirimetamina y sulfadiazina junto con ácido polínico utilizando protozoos pediátricos establecidos.

42

Alternativamente, se pueden utilizar cápsulas o suspensiones pediátricas que contengan una combinación de DIM, Artemisinina, curcumina y piperina dos veces al día. Durante el embarazo se puede utilizar indol asociado con DIM en dosis para adultos solo o con Espiramicina.

4.3.6 Uso combinado de indoles asociados con DIM con agentes antiprotozoarios para la enfermedad Tricomonal.

La vulvo-vaginitis tricomonas en las mujeres y la uretritis en los hombres son tratadas según la presente invención mediante la administración de un indol asociado con DIM además de dosis estándar de metronidazol oral (Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF, Petrin DP, Garber GE. *Treatment of infections caused by metronidazol-resistant Tricomonas vaginalis. Clin Microbiol. Rev.* Oct. 2004; 17(4):783-93). Esto puede lograrse agregando DIM, preferiblemente en un Sistema de entrega de absorción mejorada (Patente US 6,086,915) y administrando 100-200 mg oralmente una o dos veces al día durante 1.2 semanas. Alternativamente, DIM es formulado como una crema vaginal sola o en combinación con artesunato para administración tópica en mujeres infectadas. Idealmente, la crema vaginal es formulada para entrega sostenida mediante tecnología de formulación dirigida en sitio para producir cremas vaginales de dosis unitarias que son retenidas en la mucosa. Realizaciones preferidas utilizan técnicas de formulación descritas en las Patentes US #6,899,890, #6,214,379, #5,730,997, #5,554,380, #5,445,829, #5,266,329 y Solicitudes de Patente US 20030180366 y 20070154516, 20070224226, 20060140990 y 20040062802.

Opcionalmente, el indol asociado con DIM (50-500 mg) se combina con artemisinina o con un derivado tal como artesunato, que provee 100-300 mg de artesunato por dosis unitaria. La crema de combinación se usa cada 1-3 días junto con metronidazol o tinidazol oral a dosis establecidas. Alternativamente, el indol asociado con DIM se combina con Butoconazol (75-200 mg) o Clindamycin (75-200 mg) con adición opcional de artemisinina, o un derivado de artemisinina, para proveer un tratamiento para infecciones combinadas protozoarias-bacterianas o protozoarias-fungales. En otra realización, el indol asociado con DIM (50-500 mg) es combinado con extractos que incorporan el ingrediente activo del pericarpio de la fruta de *Sapindus mukorossi* para una preparación tópica con actividad anti-tricomonal y espermicida.

43
42

4.3.6.1 Uso combinado de indoles asociados con DIM con agentes antiprotozoarios y antibióticos para infecciones vaginales mezcladas

Los indoles asociados con DIM pueden formularse en emulsiones tópicas, algunas con retención mucosal sostenida y liberación de agentes activos para uso en infección vaginal mezclada. Estos usos incluyen indoles asociados con DIM en combinación con clincamicina para infecciones de levadura bacteriana, o alternativamente, combinados con un derivado de clindamicina y artemisinina para infecciones de levadura bacteriana. Los indoles asociados con DIM pueden usarse con derivados de artemisinina para infecciones combinadas de levadura de tricomonas, combinados con butoconazol para infecciones de levadura de tricomona o alternativamente, combinados con derivados de butoconazol y artemisinina para infecciones combinadas de levadura de tricomona. Realizaciones preferidas utilizan técnicas de formulación descritas en las Patentes US #6,899,890, #6,214,379, #5,730,997, #5,554,380, #5,445,829, #5,266,329 y Solicitudes de Patente US 20030180366 y 20070154516, 20070224226, 20060140990 y 20040062802. Opcionalmente, los indoles asociados con DIM pueden usarse en combinación con otros agentes antiprotozoarios incluidos metronidazol, o en combinación con agentes antifungales útiles, incluidos fármacos de azol, en particular, butoconazol. Adicionalmente, se pueden usar fármacos o extractos de productos naturales de plantas medicinales en combinación con indoles asociados con DIM y opcionalmente, un agente antiprotozoario antibacteriano o antifungal. Los productos naturales preferidos para uso combinado incluyen evodiamina, curcumina, extractos de *Sapindus mukorossi* y butirato sódico. Adicionalmente, los indoles asociados con DIM y agente opcional adicional antiprotozoario puede combinarse con espermácidas activos tópicos para preparaciones con actividades microbicidas y anticonceptivas.

4.3.7 Uso de indoles asociados con DIM para infecciones protozoarias intestinales en animales de granja

En ciertas realizaciones de la invención, las formulaciones incluyen el uso combinado de indoles asociados con DIM con agentes antiprotozoarios para tratar infecciones protozoarias intestinales en animales de granja debidas a parásitos protozoarios coccidiales o de neospora. En particular, para aditivos en comida para ganado para prevenir infección criptosporidal asociada con aborto durante la cría, aditivos de alimentación preferidos utilizan, por ejemplo, indoles asociados con DIM, genisteína, extractos o derivados de *Artemisia annua* y extractos de

44
23

Curcuma domestica. También útiles en combinación con indoles asociados con DIM están los extractos de *Yucca schidigera*.

4.3.8 Uso de indoles asociados con DIM en combinación con fármacos basados en Artemisinina

Típicamente en uso humano, se administra dos veces al día una dosis oral de 50-250 o 50-600 mg/día (1-3 o 1-6 mg/kg/día) de un indol asociado con DIM en una formulación adecuada junto con una dosis oral dos veces al día de 25-1000 mg (0.5-10 mg/kg/día) de dihidroartemisinina, artesunato u otro fármaco derivado de artemisinina en una formulación adecuada.

En una realización preferida, se administra una dosis dos veces al día de 50-550 mg/día (1-3 mg/kg/día) de indol asociado con DIM en una formulación adecuada junto con una dosis oral dos veces al día de 25-1000 mg (0.5-10 mg/kg/día) de dihidroartemisinina, artesunato u otro fármaco derivado de artemisinina en una formulación adecuada, junto con curcumina a una dosis oral dos veces al día de 25-1000 mg (0.5-10 mg/kg/día) de curcumina y 20 mg de piperina 20 mg. Preferiblemente, el extracto de piperina se denomina Bioperina® (un extracto del fruto de *Piper nigrum* L (pimienta negra) o *Piper longum* L Pimienta larga) que contiene 95% de piperina; Sabinsa Corporation, Piscataway, NJ). Preferiblemente, el indol asociado con DIM, el fármaco asociado con artemisinina, curcumina y piperina se contienen en la misma cápsula o tableta para facilitar el uso combinado.

En una segunda realización preferida, el indol asociado con DIM y el derivado de artemisinina (preferiblemente artesunato) es formulado utilizando tecnología de formulación dirigida en sitio para producir supositorios/cremas vaginales o rectales de dosis unitaria, las cuales son retenidos en la mucosa para entrega sostenida. Otras realizaciones opcionales y relacionadas utilizan técnicas de formulación descritas en las Patentes US #6,899,890, #6,214,379, #5,730,997, #5,554,380, #5,445,829, #5,266,329 y Solicitudes de Patente US 20030180366 y 20070154516, 20070224226, 20060140990, 20040062802 y 20020044961.

Para enfermedad protozoaria severa como la que se observa con malaria cerebral, enfermedad del sueño Africano, enfermedad de Chaga aguda y Leishmaniasis visceral, preferiblemente el indol asociado con DIM es administrado por vía intravenosa. DIM se administra en una suspensión o emulsión intravenosa adecuada para entregar 2-15 mg/kg por dosis cada 8 a 12 horas. DIM puede administrarse con quinina en malaria, con eflornitina, pentamidina, melarsoprol, nifurtimox o benznidazol, para trianosomiasis, y con antimonio pentavalente, anfotericina B o miltefosina en Leishmaniasis.

45
45

Para condiciones que ponen la vida en peligro, se administrarían indoles asociados con DIM intravenosos con o sin supositorios DIM y/o DIM aerosolizado adicional. Se agrega terapia con oxígeno para potenciar la eliminación de parásitos utilizando indoles asociados con DIM.

4.4 Administración y Dosificación

En ciertas realizaciones, ciertas combinaciones de indoles asociados con DIM, por ej. DIM y uno o más agentes antiprotozoarios conocidos en sistemas de entrega parenteral, sistemas de entrega oral, supositorios rectales, cremas vaginales o por entrega simultánea por múltiples rutas que proveen eficacia terapéutica se cree que proveen más que la eficacia aditiva de cada agente usado solo a una dosis máxima. Por lo tanto, los métodos que implican el uso combinado de un indol asociado con DIM y un agente antiprotozoario conocido a menos que sus dosis máximas aumentan la seguridad y la eficacia de indoles asociados con DIM y agentes antiprotozoarios en infecciones protozoarias seleccionadas.

La eficacia mejorada resulta en una duración más corta de terapia requerida que con solo con agentes individuales. El uso combinado puede permitir una reducción en la dosis o reducción del periodo de tratamiento con una dosis alta. El uso combinado puede mejorar el resultado terapéutico a largo plazo con una tasa más baja de recrudescimiento con apariencia renovada y crecimiento de parásitos sobrevivientes. El uso combinado con una dosis reducida y duración de uso puede minimizar la toxicidad.

En métodos que implican el uso oral de uno o más indoles asociados con DIM por ej. DIM, y uno o más agentes antiprotozoarios conocidos, la entrega oral del indol es facilitado y se logra de acuerdo con las formulaciones y métodos descritos en la Patente US No. 6,086,915, incorporada en este contexto por referencia. En una realización, DIM o un indol asociado con DIM es procesado con fosfatidilcolina. Alternativamente, la biodisponibilidad oral y rectal de indoles asociados con DIM se mejora con el uso de otros medios, incluida la reducción del tamaño de la partícula, complejación con fosfatidilcolina y formación en partículas y nanopartículas que se disuelven rápidamente.

El tratamiento de enfermedad protozoaria con un indol asociado con DIM oral, por ej. DIM, se facilita por la aplicación oral, sublingual, intravenosa, recta, vaginal, transdermal e intralesional de indoles asociados con DIM en dosis relativas específicas con administración simultánea de un agente antiprotozoario conocido. Estas terapias incluyen la producción de tinturas, liposomas, cremas o supositorios rectales/vaginales, emulsiones para uso intravenoso y suspensiones inyectables para entregar cantidades sinérgicas de estos agentes. Las

formulaciones inyectables incluyen indoles asociados con DIM complejados con ciclodextrina e indoles asociados con DIM encapsulados en liposoma.

Para uso oral, se usa DIM, preferiblemente formulado para una mayor absorción en dosis diaria de 0.5-12 mg/kg/día. El DIM oral es combinado opcionalmente con otros agentes orales para el tratamiento de malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis, criptosporidiosis y toxoplasmosis usando dosis estándar de los agentes adicionales.

Para uso intravenoso, se usa DIM, preferiblemente formulado como una suspensión o emulsión intravenosa en una dosis diaria de 0.5-15 mg/kg/día. DIM intravenoso es combinado opcionalmente con otros agentes orales e intravenosos para malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis, criptosporidiosis y toxoplasmosis usando dosis estándar de los agentes adicionales.

Para uso rectal, DIM es preferiblemente formulado para mayor absorción rectal en supositorios en una dosis diaria de 0.5-12 mg/kg/día. DIM es combinado opcionalmente con otros agentes rectales para malaria (artesunato, arteméter), tripanosomiasis (eflornitina, nifurtimox), leishmaniasis (miltefosina) criptosporidiosis (artesunato, arteméter) y toxoplasmosis (pirimetamina y sulfadiazina) usando dosis estándar de los agentes adicionales.

Para uso vaginal o rectal, el indol asociado con DIM es formulado usando tecnología de formulación dirigida en sitio para producir supositorios/cremas vaginales o rectales de dosis unitaria los cuales son retenidos en la mucosa para entrega sostenida. Realizaciones preferidas utilizan las técnicas de formulación descritas en las Patentes US #6,899,890, #6,214,379, #5,730,997, #5,554,380, #5,445,829, #5,266,329 y Solicitudes de Patente US 20030180366 y 20070154516, 20070224226, 20060140990, 20040062802 y 20020044961. Opcionalmente, el indol es combinado con un derivado de artemisinina (por ej: artesunato) butoconazol, tinidazol, niridazol, nitazoxanida o miltefosina.

4.5 Composiciones Farmacéuticas/Nutracéuticas

Formas de dosificación farmacéutica/nutracéutica para indoles asociados con DIM: Multi-aplicación de indol asociado con DIM que contiene partículas son fabricadas por varias técnicas, incluidas: secado por aspersión, enfriamiento por aspersión, precipitación selectiva, cristalización y otros métodos de formación de partículas. Las partículas resultantes se usan en la fabricación de las siguientes formas de dosificación, algunas de las cuales se describen en la Patente US No. 6,086,915 incorporada en este contexto por referencia.

I. Dispersiones sólidas Microencapsuladas secadas por aspersión

- 4-2
1. Partículas TPGS/fosfolípidas secadas por aspersión. La producción de la formación de la partícula del indol asociado con DIM de absorción mejorada se provee en la Patente US No. 6,086,815.
 2. Emulsiones líquidas que utilizan partículas TPGS/fosfolípidas secadas por aspersión. La producción de emulsiones para uso oral que utiliza la formación de partículas del indol asociado con DIM de absorción mejorada se provee en la Patente US No. 6,086,915
 3. Gránulos DIM saborizantes para uso oral ("rociadores" de chocolate o naranja). La producción de gránulos de sabor para uso oral utiliza las partículas del indol asociado con DIM de absorción mejorada (DIM/TPGS) según se provee en la Patente US No. 6,086,915. Los pasos de producción incluyen mezclado seco de las partículas DIM/TPGS con gránulos de amilodextrina, adición de las partículas saborizantes y granulación que utiliza un granulador de lecho fluido.

II. Dispersiones sólidas basadas en polímero secado por aspersión

Las técnicas de producción de indoles asociados con DIM pueden utilizar las que se describen en la Solicitud de Patente U.S. No. 20030072801, titulada "*Pharmaceuticals compositions comprising drug and concentration-enhancing polymers*", incorporada en su totalidad en este contexto. En particular, la producción implica los siguientes polímeros intensificadores de disolución usados con y sin estabilizadores lípidos:

1. Polímero incluido: Hidroxi Propil Metilcelulosa
2. Polímero: Hidroxi Propil Celulosa

III. Formulaciones basadas en ciclodextrina

Ejemplos de técnicas de fabricación se describen en la Patente US No. 4,877,778 y en las Solicitudes de Patente US Nos. 20040053888; 20030073665 y 20020068720, cada una de las cuales se incorpora en este contexto en su totalidad. Empleando técnicas de producción de carga de ciclodextrina para incorporar los indoles asociados con DIM se producen las siguientes formulaciones finales:

1. Complejo de partícula seca para uso oral
2. Emulsión intravenosa
3. Emulsión parenteral

IV. Dispersiones basadas en nanopartículas

42
X

Ejemplos de técnicas de fabricación se describen en las Patentes US Nos. 6,288,040; 6,165,988; 6,117,454; y en la Publicación de Solicitud de Patente US No. 20030032601; cada una de las cuales se incorpora en este contexto en su totalidad. Empleando técnicas de producción de nanopartículas para incorporar indoles asociados con DIM se producen las siguientes formulaciones finales:

1. Complejo de partícula seca para uso oral
2. Emulsión intravenosa
3. Emulsión parenteral

V. Formulaciones basadas en liposomas

Ejemplos de técnicas de fabricación se describen en las Patentes US Nos. 4,906,476; 5,006,343; y en la Publicación de Solicitud de Patente US No. 20030108597. Empleando técnicas de producción de liposomas para incorporar indoles asociados con DIM se producen las siguientes formulaciones finales:

1. Complejo de partícula seca para uso oral
2. Emulsión intravenosa
3. Emulsión parenteral

4.5.1 Productos Combinados orales

Las formulaciones combinadas para uso oral incluyen indol asociado con DIM, opcionalmente formulado para mayor absorción, combinado con uno o más compuestos antiprotozoarios adicionales y opcionalmente incluyen intensificadores de absorción adicionales. Ejemplos de compuestos antiprotozoarios preferidos incluyen: artemisinina; dihidroartemisinina; arteméter; artesunato; atovacuona; diaminopirimidinas, especialmente amodiaquina, anfotericina, clindamicina, eflornitina, fumagilina; las 8-hidroxiquinolinas, coroquina, mefloquina, halfantrina, lumefantrina, geldanamicina, yodoquinol (diiodohidroxiquina) y clioquinol (yodoclorhidroxiquina); los 2-nitroimidazoles incluidos Etanidazol, Benznidazol; doxiciclina; melarsoprol; metronidazol; miltefosina; nifurtimox; nitazoxanida; paromomicina; pentamindina; estilgluconato sódico y antimonios relacionados; suramina; pirimetamina; proguanil (cloroguanida); espiamicina; sulfadoxina; sulfonamidas incluidas trimetroprima; sulfonas y tetraciclinas; quinina derivada de la corteza del árbol chinchona de Sur América; 6-gingerol y/o 6-paradol (Sur *et al.*, 1999, *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 18(2):131-9); y flavonoides y derivados seleccionados (Tasdemir *et al.*, 2006,

49
48

Antimicrob Agents Chemother. 50(4):1352-64). Otros compuestos antiprotozoarios incluyen, mas no se limitan a: curcumina, un extracto de *Curcuma domestica*, leutilina, compuestos de selenio, especialmente ácido metilselénico, resveratrol, incluido un extracto de *Polygonium cuspidatum*, silibinina, un extracto de *Silybum marianum*, apigenina, deguelina extraída de varias fuentes de plantas, incluida *Mundulea sericea*, Evodiamina, ácido ursólico, Andrografolida, Dehidro-Andrografolida, Deoxi-Andrografolida, Brasinina, ácido caféico, Capsantina, Capsaicina, Cloruro de Queleritrina, cromolin sodio, Alil disulfuro, dialil disulfuro, Dialil sulfuro, Dialil trisulfuro, Debenzoilmetano, Ebulin 1, ácido Elágico, ácido Ferúlico, ácido 18 β -Glicirretínico, ácido Glicirrízico, trihidrato de sal de amonio, Honokiol, 5-Hidroxi-L-triptofan, Hipericina, Hipocrelina A, Idebenona, luteolina, D-Limoneno, Limonina, Glucósido de Limonina, ácido DL- α -Lipóico, Melatonina, Alcohol Perílico, Fenilbutirato, Feniletil 3-metilcafeato, Feniletil 14-metilcafeato, Fenil isotiocianato, Ácido Fítico, ácido Rosmarínico, Rutaecarpina, sulforafano, L-Treonina, Tricostatin A, aspirina, salicilamida. Se pueden agregar además agentes intensificadores de absorción incluidos, mas no limitados a: Vitamina E succinato de polietilenglicol (TPGS), piperina, limonina, D-Limoneno y/o polietilenglicol. Adicionalmente, se pueden utilizar agentes potenciadores inmunes oralmente activos además de los agentes antiprotozoarios incluidos Vitamina K3, N-Acetil-L-Cisteína, citrato de Cinc o gluconato de Cinc.

El DIM o un indol asociado con DIM, junto con uno o más compuestos antiprotozoarios y opcionalmente, un extracto de planta antiprotozoaria también se puede agregar a alimentos seleccionados como alimentos "funcionales" fortificados. Los alimentos fortificados incluyen "alimentos medicinales" los cuales requieren supervisión médica para su uso y "alimentos funcionales" disponibles a los consumidores como alimentos especializados no regulados. Típicamente, este tipo de usos en alimentos fortificados o "funcionales" aplican a Barras de Alimentos, Mezclas de Bebidas, Jugos de Vegetales, Mezclas de Pasta, Cereales secos, Polvos como reemplazo de comidas, mezclas de té y productos horneados. Estos usos requieren una producción especializada con la dosis de DIM de acuerdo con los principios de ingredientes de alimentos Considerados Generalmente como Seguros (GRAS) (*Generally Regarded As Safe*). Por lo general, estos alimentos incluyen mezclas de bebidas, polvos como reemplazo de comidas, barras de alimentos y dulces. Las formulaciones incluyen DIM o un indol asociado con DIM y uno o más de los siguientes compuestos antiprotozoarios: artemisinina, genisteína, curcumina y resveratrol. Las composiciones de DIM y de indoles asociados con DIM de la presente invención también se utilizan como ingredientes agregados a alimentos fortificados para facilitar consumo conveniente

regular para prevenir o controlar infección parasitaria protozoaria crónica. Los alimentos fortificados antiprotozoarios con DIM se usan en programas de "limpieza" periódica, cuando se usan dietas especiales y ayuno intermitente para reducir infección parasitaria intestinal. En este tipo de aplicaciones, se agrega DIM a los productos o mezclas alimenticias solo o en combinación con compuestos antiprotozoarios seleccionados, en particular; artemisinina, curcumina e isoflavonas como genisteína.

Según la presente invención, los productos de barras de alimentos se producen de acuerdo a prácticas conocidas de fabricación y cocción. La composición detallada de las barras de alimentos las técnica de fabricación útiles con DIM, indoles asociados con DIM y DIM combinado con compuestos antiprotozoarios seleccionados se describen en las Publicaciones de Solicitudes de Patente Nos. 20030068419 titulada *"Food bar compositions"* y 20020168448 titulada *"Nutricional food bar for sustained energy"*.

Según la presente invención, los productos de Mezcla de Bebida se producen de acuerdo a prácticas de fabricación conocidas. La composición detallada de mezclas de bebidas y técnicas de fabricación útiles con DIM, indoles asociados con DIM y DIM combinado con compuestos antiprotozoarios seleccionados se describen en la Patente US No. 6,599,533 de Kealey *et al.*, titulada *"Dry drink mix and chocolate flavored drink made therefrom"*.

En realizaciones preferidas, DIM es incorporado en alimentos fortificados, tales como en mezclas de bebidas y barras de alimentos, durante la producción de alimentos mediante el uso de una forma particulada de DIM que es formulada para intensificar la absorción (BioResponse-DIM [BioResponse, LLC, Boulder, CO]). Se agrega artemisina como un extracto en polvo de *Artemisia annua* (Artemisia Allergy Research Group, alameda, CA). Se agrega genisteína como una formulación en polvo de isoflavona pura (Bonistein [DSM Nutritional Products]). Típicamente, DIM se provee en una dosis de 10-75 mg/porción (40-300 mg/porción de BioResponse-DIM). Artemisinina se provee en una dosis de 50-300 mg/porción. Genisteína se provee en una dosis de 25-100 mg/porción como Bonisteína.

4.5.2 Formulaciones mucosales

Las formulaciones para administración mucosal incluyen emulsiones especializadas de indoles asociados con DIM, combinadas opcionalmente con agente antiprotozoarios conocidos las cuales son retenidas y penetran en la mucosa por largos periodos de tiempo. Estas incluyen formulaciones especializadas para mucosa oral, esofageal, rectal, vaginal y vulvar. Esta

tecnología de formulación provee una forma preferida para el tratamiento de infección tricomonas, infección Candidal e infección Criptosporidial. Para uso vaginal o rectal, el indol asociado con DIM es formulado mediante tecnología de formulación dirigida en el sitio para producir supositorios/cremas vaginales o rectales de dosis unitaria que son retenidos en la mucosa para entrega sostenida. Una realización relacionada utiliza técnicas de formulación descritas en las Patentes US Nos. 6,899,890, 5,554,380 y 5,266,329 y en las Solicitudes de Patente US Nos. 20030180366 y 20070154516. Opcionalmente, el indol asociado con DIM es combinado con un derivado de artemisinina (como artesunato), butoconazol, clindamicina, tinidazol, niridazol, nitazoxanida o miltefosina.

4.5.3 Formulaciones hepáticas

Las formulaciones hepáticas incluyen emulsiones intravenosas que se concentran en el tejido del hígado con o sin lípidos y opcionalmente incluyen anticuerpos antiprotozoarios específicos. La concentración en el tejido hepático ofrece una ventaja en el tratamiento de la etapa hepática de la malaria.

1. Emulsiones fosfolípidas intravenosas complejadas
2. emulsiones intravenosas basadas en ciclodextrina
3. Suspensión intravenosa complejada con anticuerpos monoclonales antiprotozoarios.

4.5.4 Formulaciones para Leucocitos

Las formulaciones para leucocitos incluyen emulsiones intravenosas que se concentran en leucocitos con o sin lípidos y anticuerpos antiprotozoarios específicos. La concentración en leucocitos ofrece una ventaja en el tratamiento de la etapa de leucocitos de infecciones tripanosomales y leishmaniales

1. Emulsiones fosfolípidas intravenosas complejadas
2. emulsiones intravenosas basadas en ciclodextrina
3. Suspensión intravenosa complejada con anticuerpos monoclonales antiprotozoarios.

4.5.5 Tinturas y Suspensiones DIM

La preparación de tintura permite preparar una formulación líquida absorbible de indol asociado con DIM para uso en un entorno rural. Una mezcla de indol asociado con DIM se hace opcionalmente con un compuesto antiprotozoario adicional usando etanol como solvente para proveer varias formulaciones de tintura. Los métodos para hacer tinturas apropiadas para compuestos antiprotozoarios los describe Sweet en la Patente U.S. No. 7,033,619 titulada

"Method for making herbal extracts using percolation" y métodos para tinturas de Artemisinina que describe la Patente US No. 4,952,603.

1. Tinturas orales preparadas con etanol o hexanol
2. Tintura parenteral preparada con etanol o hexanol
3. Suspensión microcristalina para uso oral
4. Suspensión microcristalina parenteral
5. Suspensión parenteral de liberación sostenida

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas según la presente invención comprenden uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y los constituyentes activos, por ej: un indol asociado con DIM solo, o un indol asociado con DIM y uno o más agentes antiprotozoarios conocidos. El/los vehículo(s) deben ser "aceptable(s)" en el sentido de que sean compatibles con los demás ingredientes de la composición y que no sean nocivos para el receptor.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículos con el cual el producto terapéutico es administrado. Los vehículos en la composición farmacéutica pueden comprender un enlazante, tal como celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona (polividona o povidona), goma tragacanto, gelatina, almidón, lactosa o monohidrato de lactosa; un agente desintegrante, tal como ácido algínico, almidón de maíz y similar; un lubricante o surfactante, tal como estearato de magnesio, o lauril sulfato sódico; un glidante, tal como dióxido de silicona coloidal; un endulcorante, tal como sucrosa o sacarina; y/o un agente saborizante como menta, metil salicilato o sabor de naranja.

Se observará que las cantidades de DIM o de otro indol asociado con DIM y/o uno o más agentes antiprotozoarios conocidos, requeridos para los tratamientos que se describen aquí podrán variar según la ruta de administración, la severidad de la enfermedad protozoaria, edad y antecedentes médicos del sujeto, formulación galénica de la composición farmacéutica, etc.

Preferiblemente, el DIM que se usa en la invención ha sido procesado para intensificar la biodisponibilidad, según se describe en la Patente US No. 6,086,915 incorporada por referencia en este contexto; sin embargo, en los métodos y composiciones de la invención se puede usar cualquier preparación adecuada de diindolilmetano puro. Opcionalmente, se pueden incluir agentes intensificadores de absorción adicionales activos con indol asociado con DIM tales como extractos de uva o extracto de pimienta negra que proveen extractos de piperina.

En general, preferiblemente en una formulación intensificadora de absorción adicional se administra una cantidad adecuada (terapéuticamente efectiva) de Diindolilmetano, según se describe en la Patente US No. 6,086,915, a 25-750 mg por día como una suspensión de micropartículas en una matriz de vehículo de almidón. Los diindolilmetanos sustituidos, derivados sintéticamente y relacionados estructuralmente según describe Jong (Publicación de solicitud de Patente US No. 2004/0043965) son administrados según la presente invención en una formulación aceptable para administración oral en una dosis de 10-400 mg/día. Preferiblemente, estos diindolilmetanos sustituidos son administrados en una formulación intensificadora de absorción a una dosis de 50 a 250 mg/día. Las cantidades de DIM o de un diindolilmetano que realmente se administren pueden ser decididas por un médico supervisor. Preferiblemente, el indol asociado con DIM de la invención es administrado en combinación con no o más agentes antiprotozoarios conocidos y administrado por vía oral, rectal o parenteral.

Las formulaciones terapéuticas incluyen aquellas adecuadas para administración parenteral (incluida intramuscular e intravenosa), tópica, oral, vaginal, rectal o intradermal. Por ello, la composición farmacéutica puede ser formulada como tableta, píldora, jarabe, cápsula, supositorio, suspensión oftálmica, formulaciones para aplicación transdermal, polvo, polvos especialmente liofilizados para reconstitución con un vehículo para administración intravenosa, etc. La administración oral de DIM es la ruta más preferida.

Las formulaciones terapéuticas adecuadas para administración oral, por ej: tabletas y píldoras, pueden obtenerse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas pueden prepararse mediante mezcla de fotoquímicos y luego comprimiendo esta mezcla en un aparato indicado para obtener tabletas de un tamaño adecuado. Antes de la mezcla, el indol asociado con DIM o uno o más agentes antiprotozoarios puede mezclarse con un enlazante, un lubricante, un intensificador de absorción, un diluyente inerte y/o un agente desintegrante.

En una realización preferida, el indol asociado con DIM es mezclado con un enlazante, tal como celulosa microcristalina, y un surfactante, tal como laurel sulfato sódico hasta que se obtenga una mezcla homogénea. En seguida, otro enlazante, tal como polivinilpirrolidona (polividona) es transferido a la mezcla agitando con una pequeña cantidad de agua. Luego se pasa la mezcla a través de cedazos de granulación y se seca por disecado antes de comprimir las tabletas en un aparato de tableado estándar.

La tableta puede ser cubierta o no recubierta. La tableta sin recubrir puede tener una ranura. Una tableta recubierta puede recubrirse con azúcar, laca, película u otros agentes de recubrimiento entérico.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen suspensiones o soluciones estériles de los constituyentes activos. Se puede usar un vehículo acuoso o aceitoso. Este tipo de vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los aceites de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soya, aceite mineral, aceite de ajonjolí y similares. Formulaciones para administración parenteral también incluyen un polvo liofilizado que comprende un fotoquímico el cual es reconstituido disolviéndolo en un vehículo farmacéuticamente aceptable que disuelva dicho fotoquímico. La administración parenteral también incluye una emulsión estable de DIM diseñada para uso intravenoso. Idealmente, la emulsión previene la remoción temprana de DIM de la circulación debido a la ingestión temprana por parte del sistema reticulo-endotelial permitiendo una máxima concentración celular de DIM en células o tejidos infectados por parásitos.

Cuando la composición farmacéutica es una cápsula, ésta puede contener un vehículo líquido tal como un aceite grasoso, como mantequilla de cacao.

Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sucrosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato sódico, monostearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerol, propilen, glicol, agua, etanol y similares. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede ser formulada como un supositorio, con enlazantes y vehículos tradicionales como triglicéridos o nerolidol, un sesquiterpeno.

Aún en otra realización, el compuesto terapéutico puede entregarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (ver Langer, supra; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 1987, 14:201; Buchwald et al., *Surgery* 1980, 88:507; Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 1989, 321:574). aún en otra realización se pueden usar materiales poliméricos (ver *medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds). CRC Pres. Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds)., Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 1983, 23:61; ver también Levy et al., *Science* 1985, 228:190; During et al., *Ann. Neurol.* 1989, 25:351; Howard et al., *J. Neurosurg.* 1989, 71:105).

54

Otros sistemas de liberación controlada se describen en la revisión de Langer (1990, *Science* 249:1527-1533).

En una realización de la composición farmacéutica según la invención, el indol asociado con DIM y uno o más agentes antiprotozoarios conocidos se comprenden como entidades separadas. Las entidades pueden ser administradas de manea simultánea o secuencial.

La invención también provee un paquete o *kit* que comprende uno o más contenedores llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones de la invención. Esto incluye la combinación de cápsulas para uso oral y supositorios rectales. Asociado opcionalmente con dicho(s) contenedor(es) puede haber un aviso en la forma que indique la agencia estatal que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, y donde se muestre la aprobación de la agencia de manufactura, uso o venta para administración humana.

Se ha citado una serie de referencias, las cuales se incorporan en este contexto por referencia.

Se podrán hacer muchas modificaciones y variaciones de esta invención sin salirse de su espíritu y alcance, como será aparente para las personas versadas en la técnica. Las realizaciones específicas que se describen aquí se ofrecen solo como ejemplo, y la invención debe limitarse solo por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de equivalentes que abarcan dichas reivindicaciones.

5. EJEMPLOS

5.1 EJEMPLO 1: Fabricación de DIM Procesado para Biodisponibilidad Oral Intensificada

La preparación de diindolilmetano procesado se hace de acuerdo con los pasos que describe la Patente US No. 6,086,915 la cual se incorpora en este contexto por referencia. En resumen, esta prelación incluyó una mezcla de aproximadamente 10-40% por peso final de Diindolilmetano con aproximadamente 10-40% por peso final de Vitamina E succinato de polietilen glicol 1000 (Vitamina-E-TPGS, Eastman Chemical), 2-20% por peso final de fosatidil colina (Phospholion 50G, Rhone Poulenc) y 15-30% por peso final de hexanol. Esta mezcla se hace homogénea por mezclado. La mezcla homogéneas de indoles y otros sustituyentes solubles de aceite que se mencionan arriba se agrega a una solución de almidón modificado en agua (*Capsul Starch from National Starch, Inc.*) El componente de almidón forma entre 30 y 70% del peso seco final del producto. La mezcla combinada final y bien dispersa se somete luego a secado por

56
5

aspersión. El producto resultante es un polvo fino que contiene Diindolilmetano contenido dentro de las partículas de almidón.

5.2 EJEMPLO 2: Fabricación de Cápsulas que contienen Diindolilmetano y ante(s) antiprotozoario(s) opcional(es)

Las cápsulas que contienen entre 150-300 mg de Diindolilmetano procesado, producidas de acuerdo con los pasos que se describen en el Ejemplo 6.1 se hacen mezclando el Diindolilmetano procesado con celulosa microcristalina y colocando el polvo mezclado en cápsulas de gelatina opaca.

Las cápsulas que contienen la combinación de aproximadamente 150 mg de DIM procesado (que proveen 50 mg de DIM) y 200-500 mg de Artemisinina y/u otros derivados de Artemisinina se hacen mezclando el DIM procesado y Artemisinina con celulosa microcristalina o un excipiente de harina de arroz y colocando el polvo mezclado en cápsulas de gelatina opaca. Alternativamente, las cápsulas o tabletas con aproximadamente 150 mg de DIM procesado que proveen 50 mg de DIM y 200-500 mg de Artemisinina, u otros derivados de Artemisinina, Curcumin 100-200 mg, y piperina 20 mg, se hacen con celulosa microcristalina o un excipiente de harina de arroz y colocando el polvo mezclado en cápsulas de gelatina opaca.

5.3 EJEMPLO 3: Fabricación de Suspensiones pediátricas con sabor de Indoles asociados con DIM

Los indoles asociados con DIM son incorporados en la fabricación de suspensiones pediátricas como mezclas en polvo para ser reconstituidas con agua antes de usarlas en pacientes. Los productos en suspensión tienen las ventajas de que duran más, son más estables y tienen un enmascarante de sabor para mejorar la palatabilidad.

Un indol asociado con DIM que contenga suspensión se hace empleando técnicas de fabricación establecidas según se describe en la Patente US No. 6,586,012 de Yu *et al.*, expedida el 1 de julio de 2003, y titulada, *Taste masked pharmaceutical compositions comprising bitter drug and pH sensitive polymer*".

En una realización preferida, el indol asociado con DIM es formulado en una suspensión pediátrica en combinación con un derivado de artemisinina, tal como artesunato, curcumina y piperina empleando un enmascarante de sabor.

5.4 EJEMPLO 4: Fabricación de DIM con un Derivado de Artemisina en un Supositorio para Administración Vaginal o Rectal

En un vaso caliente, se calentaron a 100°C 90 gramos de alcohol cetostearílico (Alfil 16/18, Vista) mezclado con 10 cc de Aceite de toronja (Aldrich

54
56

Chemical) al cual se agregaron 20 gms de DIM microcristalino, 5 o 10 gms de Artesunato (LKT Labs. St. Paul, MN), mezclando constantemente para formar una suspensión caliente. Alternativamente, se calientan a 100°C 90 gramos de alcohol cetostearílico (Alfil 16/18, Vista) a los cuales se mezclan 10 gms de DIM microcristalino y el cual se agrega a un segundo vaso de 400 gms de IV Novata (Base de supositorio de glicérido semisintético, Ashland Chemicals) y se calienta a 40°C mezclando constantemente. Al segundo vaso se agrega la suspensión bien mezclada del primer vaso mezclando continuamente. El material de supositorio fundido homogenizado se forma en supositorios de 2 g cada uno y se deja enfriar. a la mezcla fundida se agregan 10-50 g de gliceril monoesterato según sea necesario para aumentar la firmeza de los supositorios finales. Opcionalmente se agregan 50-100 mg de artesunato o arteméter por supositorio para niños y 200-300 mg de artesunato o arteméter por supositorio para adultos.

En la técnica se conocen otros métodos para producir supositorios según se describe en la Patente US No. 4,164,573 de Galinsky et al., expedida el 14 de agosto de 1979 y titulada: *"Composition and method for making a suppository for introducing a hypoglycemic agent into a mammal"*. El uso de este método provee una técnica para fabricar una mezcla de DIM y un compuesto asociado con Artemisinina el cual es luego evaporado en una masa semisólida y formada luego en un supositorio. En un formato de producto preferido, el supositorio contendría de 50-100 mg de DIM y de 50-100 mg de artesunato para niños, y de 100-300 mg de DIM y de 200-300 mg de artesunato para adultos. Opcionalmente, a las formulaciones de supositorio se les agrega Vitamina E TPGS (Eastman Chemical) o nerolidol, un sesquiterpeno, como intensificadores de penetración del fármaco.

5.5 EJEMPLO 5: Fabricación de Fórmulas de Combinación de Liberación Sostenida para Administración Vaginal o Rectal.

Las formulaciones para administración mucosal incluyen emulsiones especializadas de indoles asociados con DIM, combinadas opcionalmente con agente antiprotozoarios conocidos, las cuales son retenidas y penetradas en la mucosa por periodos de tiempo prolongados. Esto incluye formulaciones especializadas para la mucosa oral, esofageal, recta, vaginal y vulvar. Esta tecnología de formulación provee una forma preferida para el tratamiento de infección Tricomonas, infección Candidal e infección Criptosporidial. Para uso vaginal o rectal, el indol asociado con DIM se formula con tecnología de formulación dirigida en el sitio para producir supositorios/cremas vaginales o rectales de dosis unitaria las cuales son retenidas en la mucosa para entrega sostenida. Una realización relacionada utiliza técnicas de formulación descritas en

las Patentes US Nos. 6,899,890, 5,554,380, 5,266,329 y en las Solicitudes de Patente US Nos 20030180366 y 20070154516. El indol asociado con DIM es combinado con un derivado de artemisinina (como artesunato), butoconazol, clindamicin, tinidazol, niridazol, nitazoxamida o miltefosina.

5.6 EJEMPLO 6. Fabricación de formulaciones complejas de Ciclodextrina con indoles asociados con DIM para bioentrega mejorada

Introducción: Como agentes de fármacos poco solubles, los indoles asociados con DIM requieren en general pasos de formulación que intensifiquen su solubilidad y que sean biocompatibles para entrega parenteral y oral mejorada del fármaco. Las formulaciones parenterales para entrega intramuscular, intravenosa y pulmonar en aerosol se benefician de la complejación con varias ciclodextrinas (alfa-ciclodextrina, beta-ciclodextrina, hidroxipropil-beta-ciclodextrina y sulfobutileter-beta-ciclodextrina).

Métodos: Las formulaciones específicas y los pasos de formulación se realizan con el uso de ciclodextrinas. Las formulaciones se basan en métodos y observaciones de que las moléculas que contienen anillos de indol se complejan exitosamente con ciclodextrinas que proveen una ventaja de solubilidad posterior sobre el indol solo (Cao *et al.*, 2000, *Chemosphere* 40:1411-6). Por lo tanto, la formulación prototipo que utiliza DIM microcristalina, sistemas solventes compatibles, con o sin estabilizadores lípidos se hace por medio de tecnología de secado por aspersión. Los productos de partículas secas son adecuados para suspensión en vehículos acuosos para entrega intramuscular o intravenosa del fármaco.

Las ciclodextrinas preferidas son:

1. β -ciclodextrina, generalmente más aplicable para complejar moléculas hidrofóbicas. Se prevé que se necesitarán 2 moléculas de β -ciclodextrina por molécula de DIM.
2. Hidroxipropil β -ciclodextrina, que se sabe es muy soluble en el orden de 30% y más.
3. Sulfobutil β -ciclodextrina (Captisol®). Captisol tiene un peso molecular aproximado de 2200 mg/mmol así que en una proporción de 2:1 de ciclodextrina a DIM, la cantidad de DIM que puede ponerse en la solución será considerablemente más alta que la solubilidad conocida de DIM.

Preparaciones de muestra que se deben hacer:

59

Se utilizarán solventes farmacéuticamente aceptables para formar soluciones de secado por aspersión con Hidroxipropil β -ciclodextrina y Sulfobutil β -ciclodextrina. Los complejos de cada una de las β -ciclodextrinas con DIM se prepararán con un leve exceso de la ciclodextrina y se secarán por aspersión para producir aproximadamente de 10 a 20 gramos de cada formulación. Otras formulaciones adecuadas para uso en aerosol intravenoso, intramuscular y pulmonar emplearán técnicas de fabricación publicadas (Steckel *et al.*, 2004, *Int J. Pharm.* 278:187-95).

Prueba de formulaciones preparadas de DIM-ciclodextrina:

Se analizarán las muestras preparadas en cuanto a la estructura cristales de Aripiprazol Anhidro amorfa y estabilidad mediante técnicas estándar de análisis (Rodríguez-Spong *et al.*, 2004, *Adv Drug Deliv Rev.* 56:241-74). La prueba de formulaciones preparadas incluirá la prueba de liberación de DIM en ácido gástrico simulado. La prueba de liberación *in vivo* y biodisponibilidad en modelos animales y humanos utilizarán ensayos DIM de plasma según se describe en la Publicación de solicitud de Patente us No. 20030096855.

Conclusiones: Se espera que las formulaciones DIM ciclodextrina secadas por aspersión demuestren mayor durabilidad, formen suspensiones estables en soluciones de dextrosa al 5% para administración intravenosa y suspensiones estables en 0.9% de NaCl para administración intramuscular y parenteral.

5.7 EJEMPLO 7: Microemulsiones intravenosas estériles de DIM para Uso junto con el tratamiento de parásitos protozoarios

Microemulsiones estables de DIM, diseñadas para uso intravenoso son desarrolladas para proporcionar un medio conveniente de administrar DIM para alcanzar altas concentraciones de DIM en tejidos en forma rápida y en un momento predecible. Este uso facilita el uso de DIM en terapia antiprotozoaria. Adicionalmente, las microemulsiones de DIM pueden usarse junto con otros agentes antiprotozoarios. En otras realizaciones, análogos de DIM, incluidos imidazolelil-3-3'-diindolilmetano, incluidos imidazolelil-3,3'-diindolilmetanos nitro sustituidos y el derivado de DIM SR13688 (Stanford Research Institute) pueden utilizarse en infecciones de parásitos protozoarios.

La baja solubilidad de DIM tanto en agua como en lípido, requiere desarrollar una microemulsión especializada que utilice fosfolípidos para optimizar la solubilidad de DIM y mejorar la estabilidad de la microemulsión. Para preparar la microemulsión se compra Etil oleato (EO), Fosfatidil Colina (PC) (de yema de huevo) y calceína de Sigma-Aldrich, Inc (St. Louis, Mo.). Se compra Distearoil-

60
5

fosfatidiletanolamin-N-poli(etilenglicol) 200 (DSPE-PEG) de Avanti Polar Lipids (Alabaster, Ala.)

Empleando una modificación del método de Yu *et al.*, 1993, *Int. J. Pharm.* 89:139-146), la microemulsión se fabrica de la siguiente forma: se disuelven 160 gramos de EO y 60 gramos de PC en 1 litro de etanol puro. Se agregan 24 gramos de DIM microcristalino (tamaño medio de partícula: 0.25 micrones) y se disuelve en esta "fase oleosa". Luego se disuelven 20 gramos de DSPE-PEG en 500 cc de agua USP (fase acuosa). En seguida, la solución etanólica oleosa (fase oleosa) con el DIM disuelto se agrega a la solución DSPE –PEG (fase acuosa) bajo agitación magnética moderada. Como resultado de la microemulsión producida, la fase acuosa se vuelve inmediatamente lechosa con opalescencia. Luego la microemulsión es sometida a baja presión a 360 mm Hg y se mantiene a 50°C. La baja presión se usa para concentrar la emulsión mediante el retiro del etanol y una porción de agua. Empleando un ensayo de absorción infrarroja para determinar el contenido de DIM de la microemulsión, se establece una concentración final de DIM de 7.5 mg/ml. Se agrega hidróxido de sodio para aumentar el pH a un rango entre 5.0-7.5.

Utilizando esta técnica de fabricación las emulsiones de DM son preparadas y sometidas a pruebas de estabilidad para demostrar que el tamaño de la partícula dentro de la emulsión siguió siendo entre 150 y 200 nm. La técnica de producción resulta en una microemulsión con rangos de %-peso de los componentes en los siguientes rangos preferidos:

Componente	%-Peso aproximado
DIM	0.05-0.1
Lípidos (EO;PC;DSPE-PEG; 8:3:1)	45-28
Agua	50-70
Etanol	1-2

Alternativamente, se puede utilizar un método de producción libre de etanol para producir una microemulsión estable de DIM o derivados y análogos DIM, usando Lipofundin MCT/ B (Braun Melsungen AG, Melsungen, Alemania), una emulsión básica preformada y homogenización a alta presión de DIM microcristalino. Este método utiliza DIM molido en chorro, con un tamaño de partícula reducido a un diámetro promedio de 0.1 micron (hecho pro Micron Technologies, Inc., Exton, Pa.). Utilizando esta técnica, 700 mg de cristales DIM de 0.1 micron de diámetro se homogenizan en 100 cc de Lipofundin utilizando el equipo y los métodos que se describen en (Akkar *et al.*, 2003 *Eur J Pharm*

61
60

Biopharm. 55:305-12). Esto resulta en una microemulsión estable basada en lípidos con un tamaño de partícula menor de 200 nm y un contenido DIM de 7 mg/cc de la emulsión.

5.8 EJEMPLO 8: DIM estéril encapsulado en liposoma para uso Oral, Rectal y/o Intravenoso para uso conjunto con terapia antiprotozoaria

Las liposomas son vesículos microscópicos compuestos por una bicapa fosfolípida que encapsula agentes activos para entrega especializada a tejidos específicos. En ciertas realizaciones, las formulaciones DIM encapsuladas en liposomas se desarrollan para proveer una mayor concentración de DIM en tejido hepático y pulmonar en la terapia antiprotozoaria. Las técnicas de fabricación de las Liposomas DIM se hacen con base en las técnicas de fabricación de liposomas publicadas y descritas en las Patentes Nos. 4,906,476; 5,006,343; y en la Publicación de solicitud de Patente US No. 20030108597, cada una de las cuales se incorpora en este contexto por referencia. Las técnicas preferidas para producir liposomas DIM son las que resultan en liposomas que se acumulan en el pulmón y en el tejido epitelial respiratorio.

Las liposomas son formuladas utilizando N-(carbonil-metoxi-polietileno glicol 2000)-1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina sal sódica (MPGEG-DSPE) (2-4 mg/ml); fosfatidilcolina de soya completamente hidrogenada (HSPC) (2-11 mg/ml; y colesterol (1-4 mg/ml). Cada frasco producido de 30 ml contiene 30-60 mg de indol asociado con DIM a una concentración de 1-2 mg/ml.

Las liposomas DIM pueden utilizarse en casos hospitalizados de enfermedad protozoaria cada 8 a 12 horas. Preferiblemente, las liposomas DIM son administradas por vía intravenosa o rectal en caso de que el acceso intravenoso no sea posible.

5.9 EJEMPLO 9: Actividad de DIM que induce apoptosis y Compuestos antiprotozoarios en un Modelo de Cultivo celular de Malaria, Tripanosomiasis, Leishmaniasis, Criptosporidiosis, Tricomonomiasis y Blastocistosis

Introducción:

Las técnicas de cultivo celular relevantes a infecciones protozoarias humanas incluyen métodos desarrollados para probar agentes antiprotozoarios en modelos de la etapa sanguínea de malaria, modelos de la infección de macrófagos con amastigotos de *Leishmania*, modelos de infección de macrófagos con *Tripanosomas*, modelos de infección de enterocitos con *Criptosporidio*, modelos de infección con *Tricomonas* y modelos de infección de enterocitos con *Blastocistis*

66
X

Hominis. Métodos preferidos permiten condiciones de cultivo y pruebas de la respuesta de muerte celular inducida por el/los agente(s) antiprotozoario(s) atribuibles a apoptosis. Se hace la prueba de un indol asociado con DIM solo para establecer la concentración efectiva mínima en medios de cultivo y la concentración de la reducción del número de células infectadas en 50% (EC₅₀). La combinación de uno o más agentes antiprotozoarios en combinación con un indol asociado con DIM se usa para establecer la actividad aditiva o sinérgica según métodos establecidos (Nduat, 2006, *Acta Trop.* 97(3):357-63).

El siguiente cuadro muestra los métodos de estudio de cultivo y punto final *in Vitro* para uso con indoles asociados con DIM solos y en combinación.

Parásito	Método de cultivo	Método de Estudio (Ref)
Especie <i>Plasmodium</i>	<i>P. falciparum</i> en RBC humano	RBC Gemsa manchada (1,2)
Especie <i>Trypanosome</i>	<i>T. Cruzi</i> o <i>T. brucie</i> en medios	Tinte fluorométrico azul Alamar (3,4)
Especie <i>Leishmania</i>	<i>L. donovani</i> en medios	Tinte fluorométrico azul Alamar (4)
Especie <i>Cryptosporidium</i>	Células del ducto biliar humano H69	Manchado DAPI para apoptosis (5)
<i>Blastocystis Hominis</i>	Cultivo de <i>B. Hominis</i> en medios	Microscopía en contraste de fase y citometría de flujo (6)
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Cultivo de <i>T. Vaginalis</i> en medios	Cultivo aeróbico y anaeróbico con microscopía en contraste de fase invertida (7)

Referencias para los métodos *in Vitro*:

1. Kumar R, Misiyenko a, Barik s. *The heat shock protein 90 of Plasmodium falciparum and antimalarial activity of its inhibitor, gedanamycin.* Malar J. Sept 2003 15;2:30
2. Trager w., Jensen JB. *Human malaria parasites in continuous culture.* 1976. J. Parasitol. Jun 2005; 91(3):484-6
3. X. Verna NK, Dey CS. *Possible mechanism of miltefosine-mediated death of Leishmania donovani.* Antimicrob agents Chemother. Ago 2004; 48(8):3010-5
4. Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosum F, Ruedi P. *Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues. in vitro, in vivo, structure-activity relationship and quantitative structure-activity relationship studies.* Antimicrob Agents Chemother. Abr. 2006; 50(4):1352-64
5. Chen XM, Gores GJ, Paya CV, LaRusso NF. *Cryptosporidium parvum induces apoptosis in biliar epithelia by a Fas/gas ligand- dependent mechanism.* Am JI physiol. Sept 1999; 277(3 Pt 1): G599-608
6. Ho LC, Singh M, Suresh G, Ng GC, Yap EH. *Axenic culture of Blastocystis hominis in Iscove's modified Dulbecco's medium.* Parasitol Res. 1973;79(7):616-6.
7. Crowell AL, Sanders-Lewis KA, Secor WE. *In vitro metronidazole an tinidazole activities against metronidazole-resistant strains of Trichomonas vaginalis.* Antimicrob Agents Chemother. Abr. 2003; 47(4):1407-9

Se utilizan métodos establecidos para demostrar la interacción aditiva y sinérgica de indoles asociados con DIM y agentes antiprotozoarios adicionales, incluidos los métodos establecidos para *P. Falciparum* (Gupta et al, 2002, *Antimicrob Agents Chemother.* 46(5):1510-5)

En las siguientes tablas se resumen ejemplos del(os) agente(s) a ser probado(s), tanto solos como en combinación para cada especie de parásitos protozoarios más apropiados para los métodos y composiciones de la presente invención.

I. Especies de Plasmodium (P. Falciparum,, P. Ovale, P. Vivex)

Clase de Agente	Ejemplo de Agente	Rango de concentración
Indol asociado con DIM	3,3'-Diindolilmetano	.01-50 micromolar
Derivado de artimisinina	Artesunato	.001-10 micromolar
Curcumina o derivado	Curcumina	.01-50 micromolar
Cloroquina	Cloroquina	.001-20 micromolar
Quinina	Primaquina	.001-20 micromolar
Jasmonato	Metil jasmonato	.01-50 micromolar
Antibiótico	Clindamicin	.001-20 micromolar

II. Especies de Leishmania (L. donovari, L. tropica)

Clase de Agente	Ejemplo de Agente	Rango de concentración
Indol asociado con DIM	3,3'-Diindolilmetano	.01-50 micromolar
Miltefosina	Miltefosina	.01-50 micromolar
Antimonio pentavalente	Estibogluconato sódico	.01-50 micromolar
Anfotericina B	Anfotericina B	.001-20 micromolar
Pentamicina	Pentamidina	.001-20 micromolar
Campotectina	Topotecan	.01-50 micromolar

III. Especies de Tripanosoma (T. brucei, T. brucei gambiense, T. cruzi)

Clase de Agente	Ejemplo de Agente	Rango de concentración
Indol asociado con DIM	3,3'-Diindolilmetano	.01-50 micromolar
Nifurtimox	Nifurtimox	.001-20 micromolar
Benznidazol	Benznidazol	.001-20 micromolar
Arsénicos	Melarsoprol	.001-20 micromolar
Campotectinas	Topotecan	.001-20 micromolar
Inhibidor de Ornitina decarboxilasa	eflornitina	.001-20 micromolar

IV. Especies de Criptosporidium (C. parvum, C. hominis)

Clase de Agente	Ejemplo de Agente	Rango de concentración
Indol asociado con DIM	3,3'-Diindolilmetano	.01-50 micromolar
Nitazoxanina	Nitazoxanina	.001-20 micromolar

264
67

Curcumina	Curcumina	.01-50 micromolar
Artemisinina	Artesunato	.001-20 micromolar
Flavonoide	Genisteina	.01-50 micromolar

V. *Blastocystis Hominis*

Clase de Agente	Ejemplo de Agente	Rango de concentración
Indol asociado con DIM	3,3'-Diindolilmetano	.01-50 micromolar
Curcumina	Curcumina	.01-50 micromolar
Artemisinina	Artesunato	.001-20 micromolar

VI. *Tricomonas Vaginalis*

Clase de Agente	Ejemplo de Agente	Rango de concentración
Indol asociado con DIM	3,3'-Diindolilmetano	.01-50 micromolar
Curcumina	Curcumina	.01-50 micromolar
Artemisinina	Artesunato	.001-20 micromolar
Nitroimidazol	Metronidazol	.001-20 micromolar
Nitroimidazol	Tinidazol	.001-20 micromolar

Los resultados esperados incluyen la demostración de actividad antiprotozoaria de indoles asociados con DIM amplificada cuando se combinan con agente(s) antiprotozoario(s) seleccionado(s).

5.10 EJEMPLO 10. Uso de DIM solo en combinación con agentes usando modelos de malaria *in vivo*

En malaria, los esporozoitos de las glándulas salivares del mosquito entran rápidamente a la circulación luego de la picadura y localizan hepatocitos donde se multiplican y desarrollan en esquizontes de tejido. Durante esta etapa de tejido asintomático los esporozoitos atraviesan y dañan múltiples hepatocitos, aunque e ha demostrado que el hepatocito infectado final se ha vuelto resistente a apoptosis asociada con la presencia del esporozoito. La actividad antimalárica contra la etapa de hígado primaria se limita a unos pocos fármacos antiprotozoarios conocidos y se ha limitado a *P. falciparum*. Los medicamentos de combinación Atovuacuna-Proguanil, denominados Mamarona y Primaquina demuestran actividad en la etapa anti-hígado pero son costosos. Se requieren tratamientos activos adicionales contra la infección de la etapa del hígado. Los modelos de animal que usan esporozoitos *Plasmondium berghei* (Anka) en ratones se han desarrollado para probar posibles tratamientos para la infección siguiente a la

etapa del hígado de los animales con esporozoitos (van de Sand *et al.*, 2005, *Mol Microbiol.* 58(3):731-42). Los métodos de este modelo animal son adaptados para demostrar la actividad *in vivo* de indoles asociados con DIM contra la etapa del hígado de la infección por plasmodium. Adicionalmente, este modelo se presta a la demostración de la inducción de apoptosis en hepatocitos infectados por DIM, la combinación DIM-Artesunato y el uso oral de DIM-Artesunato-Curcumina, así como otras combinaciones antiprotozoarias de indol asociado con DIM.

En resumen, el siguiente es el método se usa en ratones para probar la infectividad de esporozoitos y la infección hepática *in vivo*. Ratones hembras Swiss Webster de 5 a 6 semanas reciben inyección intravenosa o intraperitoneal con indol asociado con DIM solo o en combinación con uno o más agentes antiprotozoarios, 60 minutos, 30 minutos antes de la inyección i.v. de 10^4 esporozoitos *P. berghei*. Cuarenta horas más tarde, se cosechan los hígados, se aísla el ARN total y se cuantifica la infección de malaria usando transcripción inversa seguida por PCR en tiempo real con primers que reconocen las secuencias específicas de *P. yoelli* dentro del rARN 18S previamente descrito (Bruna-Romero *et al.*, 2001, *Int. J. Parasito.* 31:1499-1502). Todos los datos *in vivo* son analizados usando la prueba *Student t* para muestras no pareadas. Típicamente, todos los experimentos se hacen dos veces con seis ratones por grupo por experimento.

También se han establecido modelos *in vivo* para probar las actividades antimaláricas eritrocíticas de indoles asociados con DIM usando la cepa *Plasmodium vinckei petteri* (279BY) y la cepa *Plasmodium yoelli nigeriensis* en ratones hembras Swiss (Singh *et al.*, 2000, *Acta Trop.* 77(2):185-93). Estos métodos son modificados para indoles asociados con DIM de administración intraperitoneal y oral solos o en combinación con otros agentes antimaláricos. Los medicamentos son inyectados por vía intraperitoneal u oral en 100 μ l de DMSO. Los niveles de parasitemia son observados estrechamente en gotas de sangre y se recogen muestras de sangre para determinar la infección en un separador de células activado por fluorescencia (Barkan *et al.*, 2000, *Int J. Parasitol.* 30(5):649-53).

Para probar ratones se usa el siguiente método adicional para la eficacia de un indol asociado con DIM, solo o en combinación con un agente antiprotozoario, contra etapas eritrocíticas *in vivo*. La prueba de supresión estándar de 4 días se usa para evaluar la eficacia de DIM y combinaciones DIM contra etapas eritrocíticas de malaria *in vivo* (Peters, 1975, *Ann. Trop. Med. Parasito.* 69:155-171). Se inyectan por vía intravenosa ratones hembras Swiss Webster, de 5 a 6

semanas, con parásitos *P. berghei* que expresan 2×10^5 GFP y una hora más tarde reciben inyección intravenosa con DIM, DIM más un segundo agente o tamponador para el grupo de control. Los ratones son tratados con DIM, DIM más un segundo agente o tamponador una vez al día durante 3 días adicionales. Para los experimentos en DIM o DIM en combinación con un segundo agente, los compuestos de prueba son administrados por vía oral o parenteral, los ratones Swiss Webster son infectados con parásitos que expresan GFP como ya se dijo, y una hora más tarde, se les administra por sonda DIM, o DIM más un segundo agente o agua sola. Luego del tratamiento, se monitorea la supervivencia de los ratones y se determina la parasitemia mediante análisis de separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Para FACS, se diluyen 2 µl de sangre en 1 ml de PBS que contenga 1% de suero de ternero fetal y 0.01% de NaN_3 , y se determina el número de células fluorescentes, usando por ejemplo el Sistema FACS Calibur con el Software CellQuest (Becton Dickinson). La importancia estadística se determina usando la prueba Student t para muestras no pareadas. Todos los experimentos se hacen dos veces con cinco ratones por grupo por experimento.

Los grupos de tratamiento y los rangos de dosis para pruebas *in vivo* de indoles asociados con DIM y agentes antiprotozoarios complementarios en ratones incluyen los siguientes:

Agente Antiprotozoario	Rango de dosis	Ruta
DIM	50-500 mg/kg/día	Oral, i.p.*, i.v.**
Artesunato	1-100 mg/kg/día	Oral, i.p.*, i.v.**
Arteméter	1-100 mg/kg/día	Oral, i.p.*, i.v.**
Dihidroartemisinina	1-100 mg/kg/día	Oral, i.p.*, i.v.**
Cloroquina	1-50 mg/kg/día	Oral, i.p.*, i.v.**
Atovacuona	1-50 mg/kg/día	Oral, i.p.*, i.v.**
Quinina	1-50 mg/kg/día	Oral, i.p.*, i.v.**
Primaquina	1-50 mg/kg/día	Oral, i.p.*, i.v.**
Proguanil	1-50 mg/kg/día	Oral, i.p.*, i.v.**
Curcumina	50-50 mg/kg/día	Oral

*i.p = intraperitoneal, **i.v. intravenosa

5.11 EJEMPLO 11: Uso de la combinación de DIM, Artemisinina y Curcumina en infección de *cryptosporidium* asociada con VIH

El esporozoito *Cryptosporidium* ha sido reportado a nivel mundial, el cual afecta especialmente a personas inmunocomprometidas y personas inmunocompetentes que tengan contacto con ganado. En individuos infectados

66⁶⁷

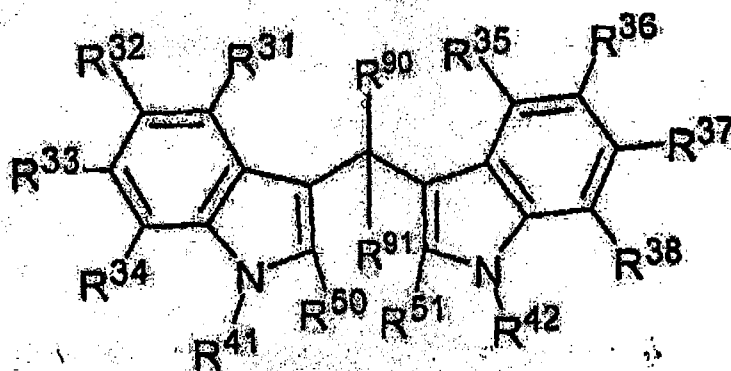
con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), muchos tendrán criptosporidiosis cuando se les diagnostique la infección con VIH y muchos la desarrollarán más tarde en el curso de la enfermedad. No existe un tratamiento efectivo específico para la criptosporidiosis y un sistema inmune intacto es el principal factor para resolver la infección. Se requieren nuevos enfoques para el tratamiento de criptosporidiosis, debido a que muchos pacientes sintomáticos infectados con VIH no tienen acceso a terapia antirretroviral altamente activa (HAART). Los pacientes infectados con VIH con conteos adecuados del linfocito CD4 son reticentes a hincar HAART por la única queja de que sufren de diarrea. La terapia con indol asociado con DIM ofrece una nueva opción terapéutica para esta infección parasítica común tanto en individuos con VIH positivo como con VIH negativo.

En este ejemplo de uso humano de tratamiento antiprotozoario oral basado en DIM, se tratará a un hombre con VIH positivo con diarrea crónica con cápsulas que contengan DIM de absorción mejorada, Artemisinina, Curcumina y Piperina (Ejemplo 6.2). El sujeto no está en terapia antirretroviral y su conteo de linfocitos CD4 es mayor de 200. El individuo se queja de diarrea crónica con 3-4 heces aguadas no formadas diariamente durante un mes. El análisis coprológico revela oocistos de *cyptosporidium hominis/parvum*. Luego de usar 2-4 cápsulas dos veces al día de la mezcla DIM/Artemisinina/Curcumina, se espera mejorar la diarrea. Luego de un mes de terapia se espera que los síntomas se resuelvan reasumiendo al patrón de heces normal y un nuevo análisis coprológico revelará que no hay oocistos *criptospridiales*. Un enfoque similar al tratamiento se usa en individuos con VIH positivo y negativo infectados con *Cyclospora*, *Isospora belli* o *Cystoisospora*.

58
X

REIVINDICACIONES:

1. Un método para el tratamiento o reducción del riesgo de una enfermedad protozoaria que comprende administrar a un sujeto que lo requiera, una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más indoles asociados con DIM y uno o más agentes antiprotozoarios.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad protozoaria es leishmaniasis o tripanosomiasis.
3. El método de la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad protozoaria es malaria, toxoplasmosis, criptosporidiosis o bebesiosis.
4. El método de la reivindicación 1 en donde dicha enfermedad protozoaria resulta de una infección de *Microsporidia*, *Trichomona*, *Cyclospora*, *Isospora* o *Blastocystis*.
5. El método de la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad protozoaria resulta de una infección de *Neospora*.
6. El método de la reivindicación 2, 3, ó 4, en donde dicho sujeto es un ser humano.
7. El método de la reivindicación 6 en donde dicho humano es inmunocomprometido.
8. El método de la reivindicación 3, en donde dicho sujeto es un cordero, ternero, cerdo, conejo o pollo.
9. El método de la reivindicación 5, en donde dicho sujeto es un mamífero no humano seleccionado del grupo compuesto por un perro, vaca, oveja, cabra y caballo.
10. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más indoles asociados con DIM son seleccionados del grupo compuesto por un compuesto de la fórmula I:



(I)

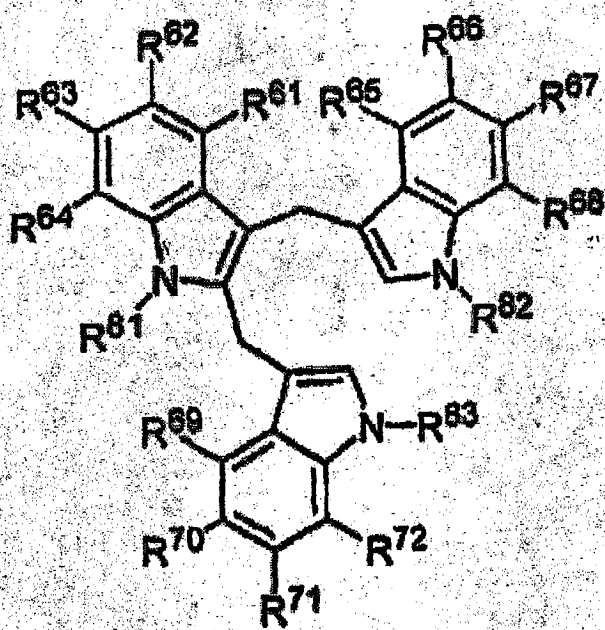
en donde R^{32} y R^{36} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, hidroxilo y metoxi, y grupos etoxycarbonilo, R^{33} y R^{37} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, hidroxilo y metoxi,

R^{31} , R^{34} , R^{35} , R^{38} , R^{41} y R^{31} son hidrógeno,

R^{50} , R^{51} son hidrógeno o metilo, y

R^{90} , R^{91} son hidrógeno;

un compuesto de la fórmula II:

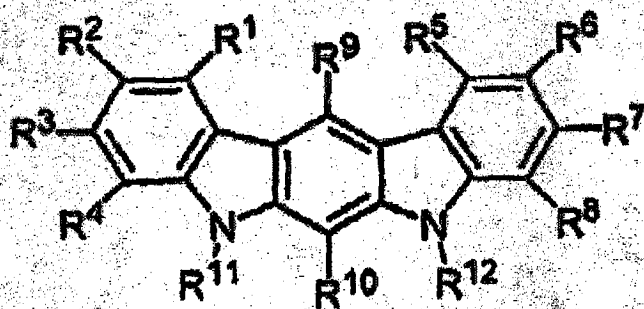


(II)

en donde R^{62} , R^{63} , R^{66} , R^{67} , R^{70} y R^{71} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, hidroxilo y metoxi, y

R^{61} , R^{64} , R^{65} , R^{68} , R^{69} , R^{72} , R^{81} , y R^{83} son hidrógeno;

un compuesto de la fórmula (III):



(III)

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 y R^{10} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_2-C_{24} , alquinilo C_2-C_{24} , arilo C_5-C_{20} , alcarilo C_6-C_{24} , aralquilo C_6-C_{24} , halo, hidroxilo, sulfhidrido, alcoxi C_1-C_{24} , alqueniloxi C_2-C_{24} , alquiniloxi C_2-C_{24} , ariloxi C_5-C_{20} , acilo, aciloxi, alcocarbonilo C_2-C_{24} , ariloxycarbonilo C_6-C_{20} , halocarbonilo,

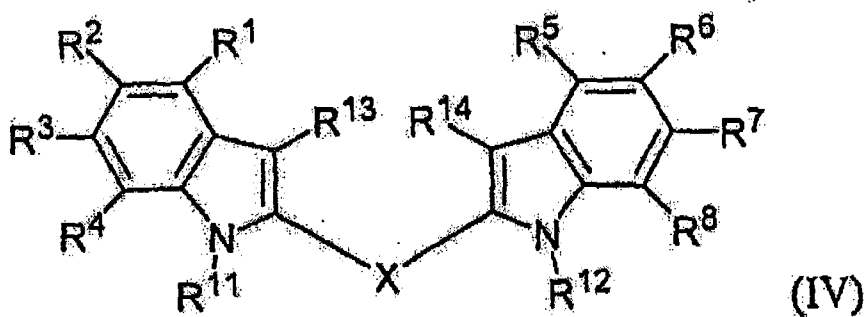
69

alquilcarbonato C₂-C₂₄, arilcarbonato C₆-C₂₀, carboxi, carboxilato, carbamoilo, carbamoilo C₁-C₂₄) mono-sustituido, carbamoilo-(alquilo C₁-C₂₄)-di-sustituido, cianato, isocianato isotiocianato, azido, formilo, tioformilo, amino, amino(alquilo C₁-C₂₄) mono y di-sustituido, amino(C₅-C₂₀) mono y di-sustituido, alquilamido C₂-C₂₄, arilamido C₆-C₂₀, imino, alquilimino, arilimino, nitro, nitroso, sulfa, sulfonato, alquilsulfanil C₁-C₂₄, arilsulfanil, alquilsulfinil C₁-C₂₄, arilsulfinil C₅-C₂₀, alquilsulfonil C₁-C₂₄, arilsulfonil C₅-C₂₀, fosfona, fosfonato, fosfinato, fosfo, fosfito y combinaciones de lo anterior, y además en donde cualquier dos sustituyentes (orto) adyacentes pueden estar enlazados para formar una estructura cíclica seleccionada de anillos de cinco miembros, anillos de seis miembros y anillos fusionados de cinco y/o seis miembros, en donde la estructura cíclica es aromática, alicíclica, heteroaromática o heteroalíclica y tiene de 0 a 4 sustituyentes de no hidrógeno y de 0 a 3 heteroátomos; y

R¹¹ y R¹² son seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C₁-C₂₄, alcóxicarbonilo C₂-C₂₄, alquilo C₁-C₂₄ amino sustituido, alquilo C₁-C₂₄ alquilamino C₁-C₂₄) sustituido y alquilo C₁-C₂₄ di-(alquilo C₁-C₂₄) amino sustituido.

con las condiciones que; al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ y R¹² es diferente de hidrógeno; y cuando R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son seleccionados de hidrógeno, halo, alquilo y alcoxí, entonces R¹¹ y R¹² son diferentes de hidrógeno y alquilo.

un compuesto de la fórmula (IV)



en donde

R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C₁-C₂₄, alquénilo C₂-C₂₄, alquínilo C₂-C₂₄, arilo C₅-C₂₀, alcarilo C₆-C₂₄, aralquilo C₆-C₂₄, halo, hidroxilo, sulfhidrilo, alcoxí C₁-C₂₄, alquéniloxi C₂-C₂₄, alquíniloxi C₂-C₂₄, ariloxi C₅-C₂₀, acilo, aciloxi, alcóxicarbonilo C₂-C₂₄, halocarbonilo, alquilcarbonato C₂-C₂₄, arilcarbonato C₆-C₂₀, carboxi, carboxilato, carbamoilo, carbamoilo (alquilo C₁-C₂₄) mono sustituido, carbamoilo (alquilo C₁-C₂₄) di-sustituido, carbamoilo,

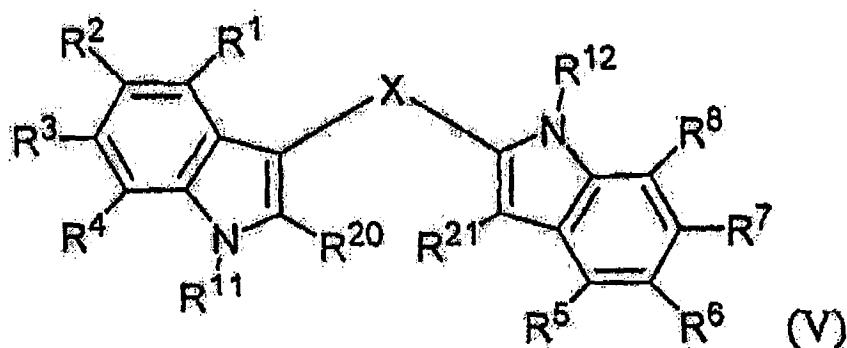
arilcarbamoilo mono sustituido, tiocarbamoilo, carbamido, ciano, isociano, cianato, isocianato, isotiocianato, azido, formilo, tioformilo, amino, amino (alquilo C₁-C₂₄) mono y di sustituido, amino (arilo C₅-C₂₀) disustituido, alquilamido C₂-C₂₄, arilamido C₅-C₂₀, imino, alquilimino, arilimino, nitro, nitroso, sulfa, sulfonato, alquilsulfanilo C₁-C₂₄, arilsulfanilo, alquilsulfinilo C₁-C₂₄, arilsulfinilo C₅-C₂₀, alquilsulfonilo C₁-C₂₄, arilsulfonilo C₅-C₂₀, fosfono, fosfonato, fosfinato, fosfo, fosfito y combinaciones de lo anterior, y además en donde dos (orto) sustituyentes adyacentes pueden estar enlazados para formar una estructura cíclica seleccionada de anillos de cinco miembros, anillos de seis miembros y anillos fusionados de cinco y/o seis miembros, en donde la estructura cíclica es aromática, alicíclica, heteroaromática o heteroalíclica, y tiene de 0 a 4 sustituyentes no de hidrógeno y de 0 a 3 heteroátomos, con la condición de que uno pero no ambos de R² y R⁶ sea amino, amino mono-sustituido o amino di-sustituido;

R¹¹ y R¹² son seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C₁-C₂₄, alcóxicarbonilo C₂-C₂₄, alquilo C₁-C₂₄ amino sustituido, alquilo C₁-C₂₄-(alquilamino C₁-C₂₄)-sustituido, y alquilo C₁-C₂₄ di(C₁-C₂₄)amino sustituido;

R¹³ y R¹⁴ se definen como para R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸, con la condición de que al menos uno de R¹³ y R¹⁴ sea diferente a hidrógeno; y

X es O, S, amileno, heteroarileno, CR¹⁵R¹⁶ o NR¹⁷, en donde R¹⁵ y R¹⁶ son hidrógeno, alquilo C₁-C₆, o juntos forman =CR¹⁸R¹⁹, donde R¹⁸ y R¹⁹ son hidrógeno o alquilo C₁-C₆, y R¹⁷ es según se define para R¹¹ y R¹².

un compuesto de la fórmula (V):



en donde

R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R¹¹, R¹² y X se definen como los compuestos de la fórmula (III); y

R²⁰ y R²¹ se definen como para, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸

72
A

11. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más indoles asociados con DIM son seleccionados del grupo compuesto por diindolilmetano, DIM hidroxilados, DIM metoxilados, 2-(Indol-3-ilmetil)-3,3'-diindolilmetano (LTR), LTR hidroxilados, LTR metoxilados, 5,5'-dimetilDIM (5-Me-DIM), 2,2'-dimetilDIM (2-Me-DIM), 5,5'-dicloroDIM (5-Cl-DIM) imidazoleil-3,'-diindolilmetano, imidazoleil-3,3'-diindolilmetanos nitro sustituidos, 2,10-dicarbetoxi-6-metoxi-5,7-dihidro-indolo-[2,3-b]carbazol, 6etoxicarboniloxi-5,7-dihidro-indolo-[2,3-b]carbazol y 2,10-dicarbetoxi-6-etoxicarbonilosí-5,7-dihidro-indolo-[2,3-b]carbazol, 2,6-dicarbetoxi-3,3'-dimetil-13,14-diindolilmetano e indol-3-carbinol.

12. El método de la reivindicación 11, en donde el indol asociado con DIM es DIM.

13. El método de la reivindicación 12, en donde el DIM es DIM procesado.

14. El método de la reivindicación 1, en donde el indol asociado con DIM es microencapsulado con fosfatidilcolina (PC) complejada con PC, o hecha en micropartículas y nanopartículas que se disuelven rápidamente.

15. El método de la reivindicación 12, en donde el DIM es microencapsulado con fosfatidilcolina (PC), complejada con PC, o hecha en micropartículas y nanopartículas que se disuelven rápidamente.

16. El método de la reivindicación 12, en donde el DIM es emulsificado en una crema para administración tópica a la mucosa vaginal o rectal.

17. El método de la reivindicación 12, donde el agente antiprotozoario es seleccionado del grupo compuesto por atovacuona, amodiaquina, anfotericina, astemizol, butoconazol, clindamicin, eflornitina, fumagilina, yodoquinol, clioquinol, Etanidazol, Benznidazol, fluoroquinolonas, enoxacina, ciprofloxacín, doxiciclina, melarsoprol, metronidazol, miltefosina, nifurtimox, nitazoxanida, paromomicina, pentamindina, estibogluconato sódico, suramina, tinidazol, pirimetamina, proguanil (cloroguanida), espiamicina y sulfadoxina.

18. El método de la reivindicación 1, en donde el agente antiprotozoario es seleccionado del grupo compuesto por artemisinina, dihidroartemisinina, arteméter, artesunato, quinina, una quinolina, halofantrina, mefloquina, lumefantrina, amodiaquina, pironaridina, piperaquina, cloroquina, hidroxicloroquina, naftoquina, primaquina, tafenoquina, amodiaquina, un 4-aminoquinolina, un curcuminoide, Genisteina, dehidrosilibina, silibin A y silibin B e isosilibin A e isosilibin B, 8-(1;1)-DMA-kaempferida, luteolin, baicalein, ácido

73
72
dihidrobetulínico, quercetina, ácido eriodictol, ácido lursólico, ácido oleanólico; y un triterpeno.

19. El método de la reivindicación 1, en donde el agente antiprotozoario es seleccionado del grupo compuesto por atovacuona, cloroquina, yodoquinol, clioquinol, ácido Jasmónico [3-oxo-2-(2-pentenil)ácido ciclopentanacético], metil jasmonato [metil 3-oxo-2-(pentenil)ácido ciclopentanacético], y *cis*-jasmon [3-metil-2-(2-pentil)-2-ciclopenten-1-ona], 3,3'-yoduro de dihexiloxacarbocianina, estibogluconato sódico, curcumina, Pirroloquinazolindiamina, Novobiocina, quercetina, ciclosporina, ácido dihidrobetulínico, una campotectina, bortezimib, etoposida, salvicina y una antraciclina.

20. El método de la reivindicación 1, en donde el agente antiprotozoario es seleccionado del grupo compuesto por un extracto de *Yucca schidigera*, un te o extracto hecho de *Artemisia annua*, tés o extracto hecho de *Curcuma domestica*, un extracto de ajo, un extracto de *Uvaria chamae* o *Hippocratea Africana*, extracto de raíz de *Homalium letestui*, un extracto de *Vernonia brasiliana*, un extracto de *sapindus mukorossi*, y un extracto de *Acanthospermum australe*.

21. El método de la reivindicación 1, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más indoles asociados con DIM y uno o más agentes antiprotozoarios es administrada con un agente promotor de diferenciación.

22. El método de la reivindicación 21, en donde dicho agente promotor de diferenciación es seleccionado del grupo compuesto por Vitamina D, un derivado de Vitamina D, calcitriol, Vitamina a, un derivado retinoide, y un factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos.

23. El método de la reivindicación 1, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más indoles asociados con DIM y uno o más agentes antiprotozoarios es administrada con un agente potenciador inmune.

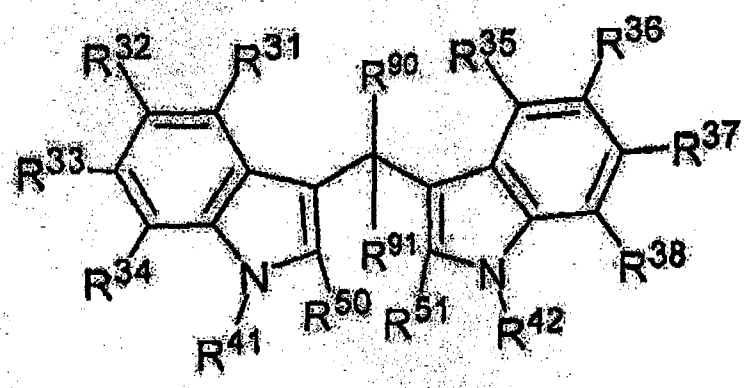
24. El método de la reivindicación 23, en donde dicho agente potenciador inmune es seleccionado del grupo compuesto por un extracto de aloe vera, un extracto de hongos, un beta-glucano y un extracto del *Panax quinquefolium*.

25. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más indoles asociados con DIM y uno o más agentes antiprotozoarios son administrados en forma simultanea.

26. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más indoles asociados con DIM y uno o más agentes antiprotozoarios son administrados dentro de un corto tiempo entre sí.

74
3

27. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más indoles asociados con DIM son administrados por vía intravenosa, oral, tópica, vaginal o rectal.
28. Un método para el tratamiento o reducción del riesgo de una enfermedad protozoaria que comprende administrar a un sujeto que lo requiera, una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más indoles asociados con DIM.
29. El método de la reivindicación 28, en donde dicha enfermedad protozoaria es leishmaniasis o tripanosomiasis.
30. El método de la reivindicación 28, en donde dicha enfermedad protozoaria es malaria, toxoplasmosis, criptosporidiosis o bebesiosis.
31. El método de la reivindicación 28, en donde dicha enfermedad protozoaria resulta de una infección de *Microsporidia*, *Tricomonas*, *Cyclospora*, *Isospora* o *Blastocystis*.
32. El método de la reivindicación 28, en donde dicha enfermedad protozoaria resulta de una infección con *Neospora*.
33. El método de la reivindicación 29, 30 o 31, en donde dicho sujeto es un ser humano.
34. El método de la reivindicación 33, en donde dicho ser humano está inmunocomprometido.
35. El método de la reivindicación 30, en donde dicho sujeto es un cordero, ternero, cerdo, conejo o pollo.
36. El método de la reivindicación 32, en donde dicho sujeto es un mamífero no humano seleccionado del grupo compuesto por perro, vaca, oveja, cabra y caballo.
37. El método de la reivindicación 28, en donde el uno o más indoles asociados con DIM son seleccionados del grupo compuesto por un compuesto de la fórmula I:



75
2/4

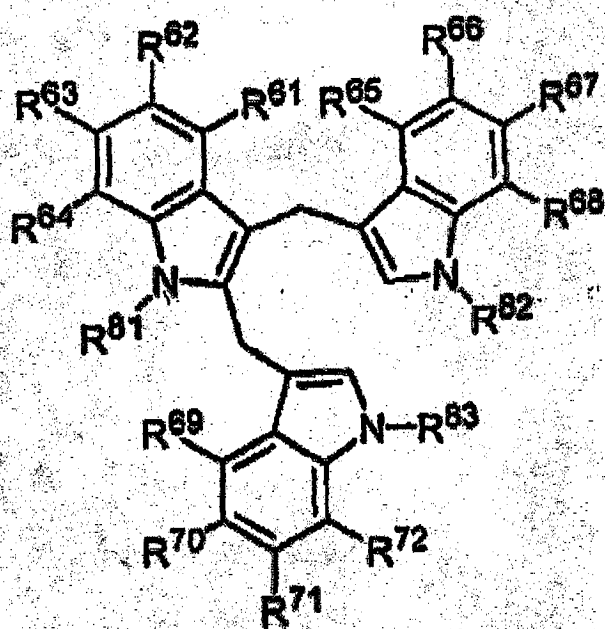
en donde R^{32} y R^{36} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, hidroxilo y metoxi, y grupos etoxycarbonilo, R^{33} y R^{37} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, hidroxilo y metoxi,

R^{31} , R^{34} , R^{35} , R^{38} , R^{41} y R^{31} son hidrógeno,

R^{50} , R^{51} son hidrógeno o metilo, y

R^{90} , R^{91} son hidrógeno;

un compuesto de la fórmula II:

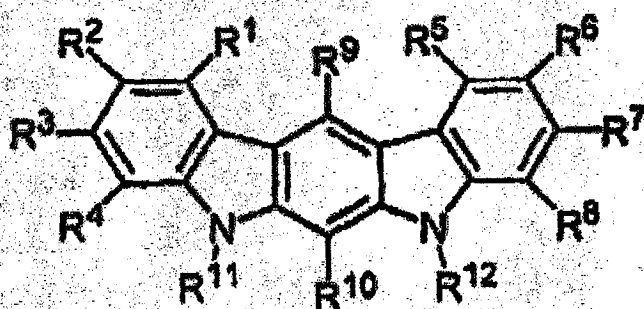


(II)

en donde R^{62} , R^{63} , R^{66} , R^{67} , R^{70} y R^{71} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, hidroxilo y metoxi, y

R^{61} , R^{64} , R^{65} , R^{68} , R^{69} , R^{72} , R^{61} , y R^{63} son hidrógeno;

un compuesto de la fórmula (III):



(III)

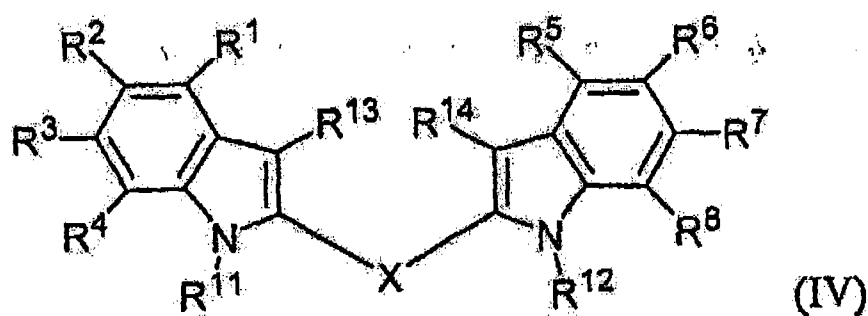
R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 y R^{10} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_2-C_{24} , alquínilo C_2-C_{24} , arilo C_5-C_{20} , alcarilo C_6-C_{24} , aralquilo C_6-C_{24} , halo, hidroxilo, sulfhidrido, alcoxi C_1-C_{24} , alqueniloxi C_2-C_{24} , alquíniloxi C_2-C_{24} , ariloxi C_5-C_{20} , acilo,

aciloxi, alcóxicarbonilo C₂-C₂₄, ariloxicarbonilo C₆-C₂₀, halocarbonilo, alquilcarbonato C₂-C₂₄, arilcarbonato C₆-C₂₀, carboxi, carboxilato, carbamoilo, carbamoilo C₁-C₂₄) mono-sustituido, carbamoilo-(alquilo C₁-C₂₄)-di-sustituido, cianato, isocianato isotiocianato, azido, formilo, tioformilo, amino, amino(alquilo C₁-C₂₄) mono y di-sustituido, amino(C₅-C₂₀) mono y di-sustituido, alquilamido C₂-C₂₄, arilamido C₆-C₂₀, imino, alquilimino, arilimino, nitro, nitroso, sulfa, sulfonato, alquilsulfanil C₁-C₂₄, arilsulfanil, alquilsulfinil C₁-C₂₄, arilsulfinil C₅-C₂₀, alquilsulfonil C₁-C₂₄, arilsulfonil C₅-C₂₀, fosfono, fosfonato, fosfinato, fosfo, fosfito y combinaciones de lo anterior, y además en donde cualquier dos sustituyentes (orto) adyacentes pueden estar enlazados para formar una estructura cíclica seleccionado de anillos de cinco miembros, anillos de seis miembros y anillos fusionados de cinco y/o seis miembros, en donde la estructura cíclica es aromática, alicíclica, heteroaromática o heteroalíclica y tiene de 0 a 4 sustituyentes de no hidrógeno y de 0 a 3 heteroátomos; y

R¹¹ y R¹² son seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C₁-C₂₄, alcóxicarbonilo C₂-C₂₄, alquilo C₁-C₂₄ amino sustituido, alquilo C₁-C₂₄ alquilamino C₁-C₂₄) sustituido y alquilo C₁-C₂₄ di-(alquilo C₁-C₂₄) amino sustituido.

con las condiciones que; al menos uno de R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ y R¹² es diferente de hidrógeno; y cuando R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son seleccionados de hidrógeno, halo, alquilo y alcoxi, entonces R¹¹ y R¹² son diferentes de hidrógeno y alquilo.

un compuesto de la fórmula (IV)



en donde

R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C₁-C₂₄, alquénilo C₂-C₂₄, alquínilo C₂-C₂₄, arilo C₅-C₂₀, alcarilo C₆-C₂₄, aralquilo C₆-C₂₄, halo, hidroxilo, sulfhidrilo, alcoxi C₁-C₂₄, alquéniloxi C₂-C₂₄, alquíniloxi C₂-C₂₄, ariloxi C₅-C₂₀, acilo, aciloxi, alcóxicarbonilo C₂-C₂₄, halocarbonilo, alquilcarbonato C₂-C₂₄, arilcarbonato C₆-C₂₀, carboxi, carboxilato, carbamoilo, carbamoilo (alquilo C₁-C₂₄)

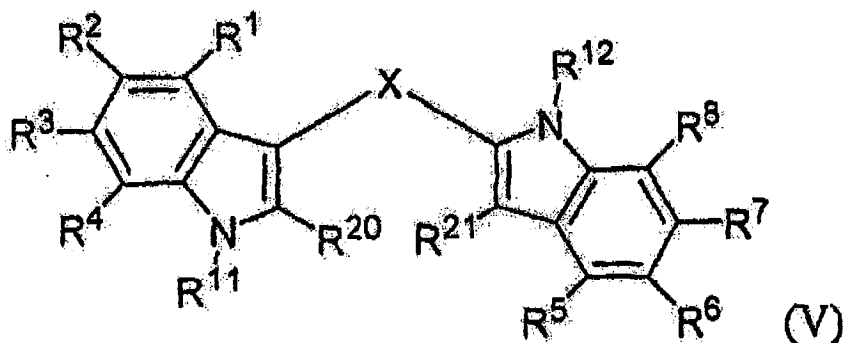
mono sustituido, carbamoilo (alquilo C₁-C₂₄) di-sustituido, carbamoilo, arilcarbamoilo mono sustituido, tiocarbamoilo, carbamido, ciano, isociano, cianato, isocianato, isotiocianato, azido, formilo, tioformilo, amino, amino (alquilo C₁-C₂₄) mono y di sustituido, amino (arilo C₅-C₂₀) disustituido, alquilamido C₂-C₂₄, arilamido C₅-C₂₀, imino, alquilimino, arilimino, nitro, nitroso, sulfa, sulfonato, alquilsulfanilo C₁-C₂₄, arilsulfanilo, alquilsulfinilo C₁-C₂₄, arilsulfinilo C₅-C₂₀, alquilsulfonilo C₁-C₂₄, arilsulfonilo C₅-C₂₀, fosfono, fosfonato, fosfinato, fosfo, fosfito y combinaciones de lo anterior, y además en donde dos (orto) sustituyentes adyacentes pueden estar enlazados para formar una estructura cíclica seleccionada de anillos de cinco miembros, anillos de seis miembros y anillos fusionados de cinco y/o seis miembros, en donde la estructura cíclica es aromática, alicíclica, heteroaromática o heteroalíclica, y tiene de 0 a 4 sustituyentes no de hidrógeno y de 0 a 3 heteroátomos, con la condición de que uno pero no ambos de R² y R⁶ sea amino, amino mono-sustituido o amino di-sustituido;

R¹¹ y R¹² son seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C₁-C₂₄, alcoxicarbonilo C₂-C₂₄, alquilo C₁-C₂₄ amino sustituido, alquilo C₁-C₂₄-(alquilamino C₁-C₂₄)-sustituido, y alquilo C₁-C₂₄ di(C₁-C₂₄)amino sustituido;

R¹³ y R¹⁴ se definen como para R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸, con la condición de que al menos uno de R¹³ y R¹⁴ sea diferente a hidrógeno; y

X es O, S, amileno, heteroarileno, CR¹⁵R¹⁶ o NR¹⁷, en donde R¹⁵ y R¹⁶ son hidrógeno, alquilo C₁-C₆, o juntos forman =CR¹⁸R¹⁹, donde R¹⁸ y R¹⁹ son hidrógeno o alquilo C₁-C₆, y R¹⁷ es según se define para R¹¹ y R¹².

un compuesto de la fórmula (V):



en donde

R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R¹¹, R¹² y X se definen como los compuestos de la fórmula (III); y

R²⁰ y R²¹ se definen como para, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸

38. El método de la reivindicación 28, donde el uno o más indoles asociados con DIM son seleccionados del grupo compuesto por diindolilmetano, DIM hidroxilados, DIM metoxilados, 2-(Indol-3-ilmetil)-3,3'-diindolilmetano (LTR), LTR hidroxilados, LTR metoxilados, 5,5'-dimetilDIM (5-Me-DIM), 2,2'-dimetilDIM (2-Me-DIM), 5,5'-dicloroDIM (5-Cl-DIM) imidazolelil-3,'-diindolilmetano, imidazolelil-3,3'-diindolilmetanos nitro sustituidos, 2,10-dicarbetoxi-6-metoxi-5,7-dihidro-indolo-[2,3-b]carbazol, 6etoxicarboniloxi-5,7-dihidro-indolo-[2,3-b]carbazol y 2,10-dicarbetoxi-6-etoxicarboniloxi-5,7-dihidro-indolo-[2,3-b]carbazol, 2,6-dicarbetoxi-3,3'-dimetil-13,14-diindolilmetano e indol-3-carbinol.

39. El método de la reivindicación 38, en donde el indol asociado con DIM es DIM.

40. El método de la reivindicación 39, en donde el DIM es DIM procesado.

41. El método de la reivindicación 28, en donde el indol asociado con DIM es microencapsulado con fosfatidilcolina (PC) complejada con PC, o hecha en micropartículas y nanopartículas que se disuelven rápidamente.

42. El método de la reivindicación 39, en donde el DIM es microencapsulado con fosfatidilcolina (PC), complejada con PC, o hecha en micropartículas y nanopartículas que se disuelven rápidamente.

43. El método de la reivindicación 39, en donde el DIM es emulsificado en una crema para administración tópica a la mucosa vaginal o rectal.

44. El método de la reivindicación 28, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más indoles asociados con DIM es administrado con un agente promotor de diferenciación.

45. El método de la reivindicación 44, en donde dicho agente promotor de diferenciación es seleccionado del grupo compuesto por Vitamina D, un derivado de vitamina D, calcitriol, vitamina A, un derivado retinoide, y un factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos.

46. El método de la reivindicación 28, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más indoles asociados con DIM y uno o más agentes antiprotozoarios es administrada con un agente potenciador inmune.

47. El método de la reivindicación 46, en donde dicho agente potenciador inmune es seleccionado del grupo compuesto por un extracto de aloe vera, un extracto de hongos, un beta-glucano y un extracto del *Panax quinquefolium*.

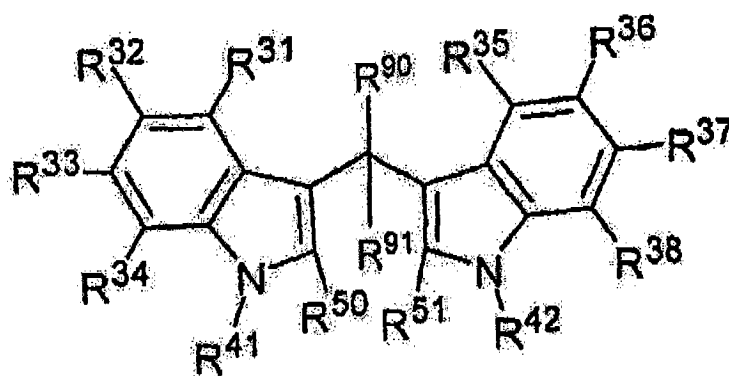
48. El método de la reivindicación 28, en donde el uno o más indoles asociados con DIM son administrados por vía intravenosa, oral, tópica, vaginal o rectal.

49. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la combinación de uno o más indoles asociados con DIM y uno o más agentes antiprotzoarios.

50. La composición de la reivindicación 49, en donde el uno o más indoles asociados con DIM son seleccionados del grupo compuesto por:

un compuesto de la Fórmula I:

un compuesto de la fórmula I:



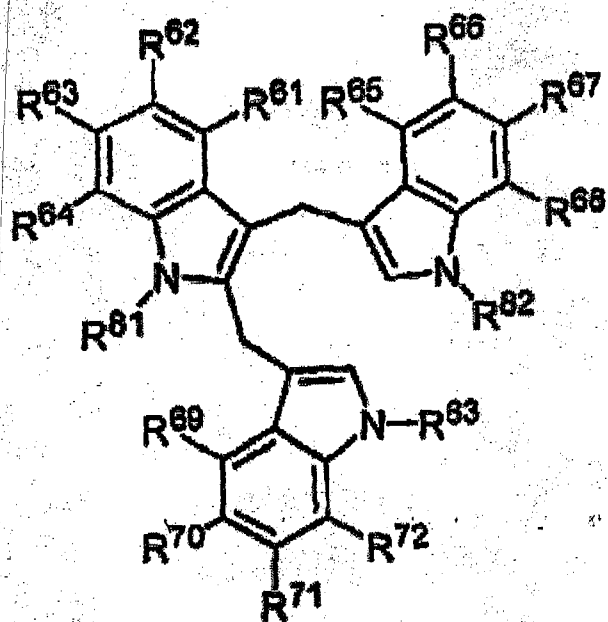
en donde R³² y R³⁶ son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, hidroxilo y metoxi, y grupos etoxicarbonilo, R³³ y R³⁷ son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, hidroxilo y metoxi,

R³¹, R³⁴, R³⁵, R³⁸, R⁴¹ y R⁴² son hidrógeno,

R⁵⁰, R⁵¹ son hidrógeno o metilo, y

R⁹⁰, R⁹¹ son hidrógeno;

un compuesto de la fórmula II:

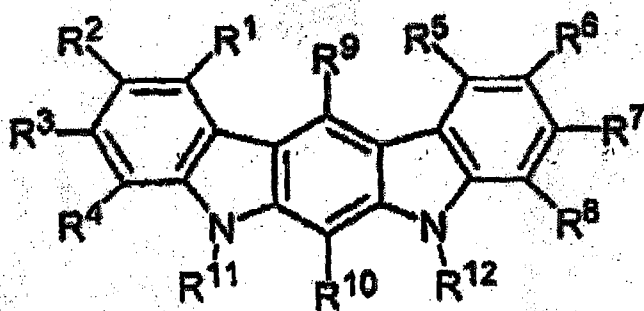


(II)

en donde R^{62} , R^{63} , R^{66} , R^{67} , R^{70} y R^{71} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, hidroxilo y metoxi, y

R^{61} , R^{64} , R^{65} , R^{68} , R^{69} , R^{72} , R^{81} , y R^{82} son hidrógeno;

un compuesto de la fórmula (III):



(III)

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 y R^{10} son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C_1-C_4 , alqueno C_2-C_{24} , alquino C_2-C_{24} , arilo C_5-C_{20} , alcarilo C_6-C_{24} , aralquilo C_6-C_{24} , halo, hidroxilo, sulfhidrilo, alcoxi C_1-C_{24} , alquenilo C_2-C_{24} , alquino C_2-C_{24} , arilo C_5-C_{20} , acilo, aciloxi, alcoxycarbonilo C_2-C_{24} , ariloxycarbonilo C_6-C_{20} , halocarbonilo, alquylcarbonato C_2-C_{24} , arilcarbonato C_6-C_{20} , carboxi, carboxilato, carbamoilo, carbamoilo (C_1-C_{24}) mono-sustituido, carbamoilo-(alquilo C_1-C_{24})-di-sustituido, cianato, isocianato isotiocianato, azido, formilo, tioformilo, amino, amino(alquilo C_1-C_{24}) mono y di-sustituido, amino(C_5-C_{20}) mono y di-sustituido, alquylamido C_2-C_{24} , arilamido C_6-C_{20} , imino, alquylimino, arilimino, nitro, nitroso, sulfa, sulfonato, alquylsulfanil C_1-C_{24} , arilsulfanil, alquylsulfonil C_1-C_{24} , arilsulfonil C_5-C_{20} , fosfono, fosfonato, fosfinato, fosfo, fosfito y combinaciones de lo anterior, y además en donde cualquier dos sustituyentes (orto) adyacentes pueden estar enlazados para formar una estructura cíclica

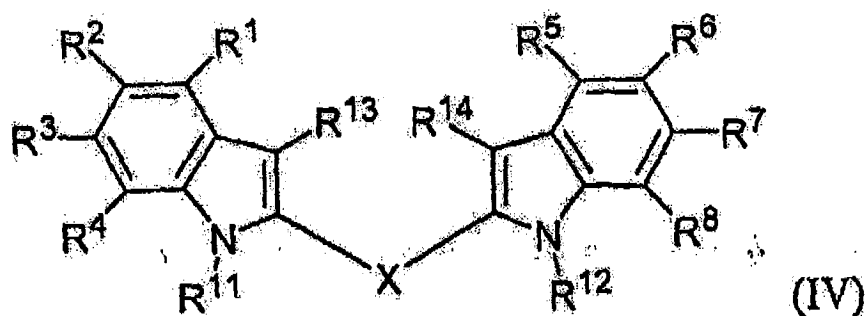
40
VEI

seleccionado de anillos de cinco miembros, anillos de seis miembros y anillos fusionados de cinco y/o seis miembros, en donde la estructura cíclica es aromática, alicíclica, heteroaromática o heteroalíclica y tiene de 0 a 4 sustituyentes de no hidrógeno y de 0 a 3 heteroátomos; y

R^{11} y R^{12} son seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C_1-C_{24} , alcoxicarbonilo C_2-C_{24} , alquilo C_1-C_{24} amino sustituido, alquilo C_1-C_{24} alquilamino C_1-C_{24} sustituido y alquilo C_1-C_{24} di-(alquilo C_1-C_{24}) amino sustituido.

con las condiciones que; al menos uno de $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}$ y R^{12} es diferente de hidrógeno; y cuando $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7$ y R^8 son seleccionados de hidrógeno, halo, alquilo y alcoxi, entonces R^{11} y R^{12} son diferentes de hidrógeno y alquilo.

un compuesto de la fórmula (IV)



en donde

$R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8$ son sustituyentes seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C_1-C_{24} , alquenilo C_2-C_{24} , alquinilo C_2-C_{24} , arilo C_5-C_{20} , alcarilo C_6-C_{24} , aralquilo C_6-C_{24} , halo, hidroxilo, sulfhidrilo, alcoxi C_1-C_{24} , alqueniloxi C_2-C_{24} , alquiniloxi C_2-C_{24} , ariloxi C_5-C_{20} , acilo, aciloxi, alcoxicarbonilo C_2-C_{24} , halocarbonilo, alquilcarbonato C_2-C_{24} , arilcarbonato C_6-C_{20} , carboxi, carboxilato, carbamoilo, carbamoilo (alquilo C_1-C_{24}) mono sustituido, carbamoilo (alquilo C_1-C_{24}) di-sustituido, carbamoilo, arilcarbamoilo mono sustituido, tiocarbamoilo, carbamido, ciano, isociano, cianato, isocianato, isotiocianato, azido, formilo, tioformilo, amino, amino (alquilo C_1-C_{24}) mono y di sustituido, amino (arilo C_5-C_{20}) disustituido, alquilamido C_2-C_{24} , arilamido C_5-C_{20} , imino, alquilimino, arilimino, nitro, nitroso, sulfa, sulfonato, alquilsulfanilo C_1-C_{24} , arilsulfanilo, alquilsulfinilo C_1-C_{24} , arilsulfinilo C_5-C_{20} , alquilsulfonilo C_1-C_{24} , arilsulfonilo C_5-C_{20} , fosfono, fosfonato, fosfinato, fosfo, fosfito y combinaciones de lo anterior, y además en donde dos (orto) sustituyentes adyacentes pueden estar enlazados para formar una estructura cíclica seleccionada de anillos de cinco miembros, anillos de seis miembros y anillos fusionados de cinco y/o seis

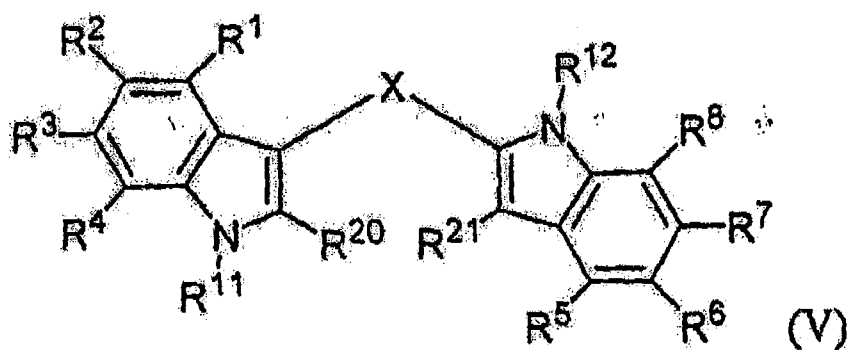
miembros, en donde la estructura cíclica es aromática, alicíclica, heteroaromática o heteroalíclica, y tiene de 0 a 4 sustituyentes no de hidrógeno y de 0 a 3 heteroátomos, con la condición de que uno pero no ambos de R^2 y R^6 sea amino, amino mono-sustituido o amino di-sustituido;

R^{11} y R^{12} son seleccionados independientemente del grupo compuesto por hidrógeno, alquilo C_1-C_{24} , alcóxicarbonilo C_2-C_{24} , alquilo C_1-C_{24} amino sustituido, alquilo C_1-C_{24} -(alquilamino C_1-C_{24})-sustituido, y alquilo C_1-C_{24} di(C_1-C_{24})amino sustituido;

R^{13} y R^{14} se definen como para R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 y R^8 , con la condición de que al menos uno de R^{13} y R^{14} sea diferente a hidrógeno; y

X es O, S, amileno, heteroarileno, $CR^{15}R^{16}$ o NR^{17} , en donde R^{15} y R^{16} son hidrógeno, alquilo C_1-C_6 , o juntos forman $=CR^{18}R^{19}$, donde R^{18} y R^{19} son hidrógeno o alquilo C_1-C_6 , y R^{17} es según se define para R^{11} y R^{12} .

un compuesto de la fórmula (V):



en donde

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^{11} , R^{12} y X se definen como los compuestos de la fórmula (III); y

R^{20} y R^{21} se definen como para, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 y R^8

51. La composición según la reivindicación 49, en donde el uno o más indoles asociados con DIM son seleccionados del grupo compuesto por diindolilmetano, DIM hidroxilados, DIM metoxilados, 2-(Indol-3-ilmetil)-3,3'-diindolilmetano (LTR), LTR hidroxilados, LTR metoxilados, 5,5'-dimetilDIM (5-Me-DIM), 2,2'-dimetilDIM (2-Me-DIM), 5,5'-dicloroDIM (5-Cl-DIM) imidazolelil-3,3'-diindolilmetano, imidazolelil-3,3'-diindolilmetanos nitro sustituidos, 2,10-dicarbeto-6-metoxi-5,7-dihidro-indolo-[2,3-b]carbazol, 6etoxicarboniloxi-5,7-dihidro-indolo-[2,3-b]carbazol y 2,10-dicarbeto-6-etoxicarboniloxi-5,7-dihidro-indolo-[2,3-b]carbazol, 2,6-dicarbeto-3,3'-dimetil-13,14-diindolilmetano.

52. La composición de la reivindicación 49, en donde el agente antiprotozoario es seleccionado del grupo compuesto por atovacuona, amodiaquina, anfotericina, astemizol, butoconazol, clindamicin, eflornitina, fumagilina, yodoquinol, clioquinol, Etanidazol, Benznidazol, fluoroquinolonas, enoxacina, ciprofloxacín, doxiciclina, melarsoprol, metronidazol, miltefosina, nifurtimox, nitazoxanida, paromomicina, pentamindina, estibogluconato sódico, suramin, tinidazol, pirimetamina, proguanil (cloroguanida), espiamicina y sulfadoxina.

53. La composición según la reivindicación 49, en donde el agente antiprotozoario es seleccionado del grupo compuesto por artemisinina, dihidroartemisinina, arteméter, artesunato, quinina, una quinolina, halofantrina, mefloquina, lumefantrina, amodiaquina, pironaridina, piperaquina, cloroquina, hidroxiclороquina, naftoquina, primaquina, tafenoquina, amodiaquina una 4-aminoquinolina, un curcuminóide, Genisteina, dehidrosilibin, silibin A, silibin B, isosilibin A, isosilibin B, 8-(1;1)-DMA- kaempferida, luteolin, baicalein, ácido dihidrobetulínico, quercetina, ácido eriodictol, ácido lursólico, ácido oleanólico; y un triterpeno.

54. La composición de la reivindicación 49, en donde el agente antiprotozoario es seleccionado del grupo compuesto por atovacuona, cloroquina, yodoquinol, clioquinol, ácido Jasmónico [3-oxo-2-(2-pentenil)ácido ciclopentanacético], metil jasmonato [metil 3-oxo-2-(2-pentenil)ácido ciclopentanacético], y *cis*-jasmon [3-metil-2-(2-pentil)-2-ciclopenten-1-ona], 3,3'-yoduro de dihexiloxacarbocianina, estibogluconato sódico, curcumina, Pirroloquinazolidinamina, Novobiocina, quercetina, ciclosporina, ácido dihidrobetulínico, una campotectina, bortezimib, etoposida, salvicina y una antraciclina.

55. La composición de la reivindicación 49, en donde el agente antiprotozoario es seleccionado del grupo compuesto por un extracto de *Yucca schidigera*, un té o extracto hecho de *Artemisia annua*, té o extracto hecho de *Curcuma domestica*, un extracto de ajo, un extracto de *Uvaria chamae* o *Hippocratea Africana*, extracto de raíz de *Homalium letestui*, un extracto de *Vernonia brasiliensis*, un extracto de *sapindus mukorossi*, y un extracto de *Acanthospermum australe*.

56. La composición de la reivindicación 49, en donde el indol asociado con DIM es un DIM.

57. La composición de la reivindicación 56, en donde el DIM es un DIM procesado.

84
987

58. La composición de la reivindicación 49, en donde el indol asociado con DIM es microencapsulado con fosfatidilcolina (PC), complejada con PC, o hecha en micropartículas y nanopartículas que se disuelven rápidamente.

59. La composición de la reivindicación 56, en donde el DIM es microencapsulado con fosfatidilcolina (PC), complejada con PC, o hecha en micropartículas y nanopartículas que se disuelven rápidamente.

60. La composición de la reivindicación 49, en donde la composición es formulada para administración oral, intravenosa, vaginal, rectal o tópica.

61. La composición de la reivindicación 49 ó 57, en donde la composición es formulada como un suplemento dietético, alimento fortificado, mezcla de bebida o mezcla de té.

62. La composición de la reivindicación 49 que además comprende Vitamina E polietilenglicol succinato (TPGS), piperina, limonina, D-limoneno o polietilenglicol.

63. La composición de la reivindicación 56 ó 57, en donde la composición es formulada para administración oral.

64. La composición de la reivindicación 56, en donde el DIM y el agente antiprotozoario son emulsificados en una crema para administración tópica a la mucosa vaginal o rectal.

85
84
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-054148- -00000-0000

Fecha: 2009-05-27 12:22:55 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 83

Comercio

SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD

☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL

☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO

☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Eduar Navarro
Firma Responsable

Fecha

27/05/09

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CASTILLO GIBSON LUIS FELIPE

REFERENCIA	Radicación No.	9 54148
	Solicitud internacional	PCT/US2007/022649
	Fecha inicio fase nacional	27/05/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 0 7 5 9 8

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

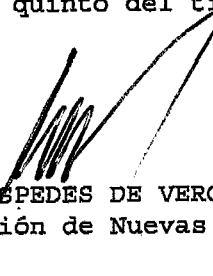
Doctor(a)
CASTILLO GIBSON LUIS FELIPE
Apoderado(a) y/o Representante de
BIORESPONSE, LL.C

REFERENCIA	Radicación No.	9 54148
	Solicitud internacional	PCT/US2007/022649
	Fecha inicio fase nacional	27/05/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 07600

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única Nº 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPÉDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 10 JUL. 2009
adpall