

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Descubrimiento de nuevas moléculas activas frente a  
Trypanosoma cruzi y Leishmania donovani**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Irene Roquero Tenorio**

Director

**Juan Cantizani Pérez**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología



**TESIS DOCTORAL**

**Descubrimiento de nuevas moléculas activas frente a *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania donovani***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Irene Roquero Tenorio**

DIRECTOR

Dr. Juan Cantizani Pérez

**Madrid, 2021**



El Dr. Juan Cantizani Pérez, Principal Scientist en GSK, certifica que:

La Tesis Doctoral titulada

**“Descubrimiento de nuevas moléculas activas frente a *Trypanosoma cruzi* y  
*Leishmania donovani*”**

presentada por la Licenciada en Farmacia **Dña. Irene Roquero Tenorio**, ha sido realizada en la *Kinetoplastids Research Unit* de GSK y cumple con las exigencias para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Como director de la presente Tesis Doctoral y de acuerdo con la normativa vigente, se firma el presente certificado autorizando su defensa.

En Madrid, a 2 de febrero de 2021.

Dr. Juan Cantizani Pérez

Fdo.:







U N I V E R S I D A D  
**COMPLUTENSE**  
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. \_\_\_\_\_,  
estudiante en el Programa de Doctorado \_\_\_\_\_,  
de la Facultad de \_\_\_\_\_ de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

\_\_\_\_\_

y dirigida por: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Fdo.: \_\_\_\_\_



A mi familia,  
en especial a mi abuelo Carlos



La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a:

*Tres Cantos Open Lab Foundation (TCOLF)*

GSK

*California Institute for Biomedical Research (Calibr)*



## AGRADECIMIENTOS

Durante este capítulo tan importante en mi vida profesional quiero agradecer a muchas personas su apoyo constante y la confianza que han depositado en mí. Esta Tesis también es vuestra.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director, Juan Cantizani, su apoyo, sus buenos consejos, su ayuda y su paciencia durante estos años. Gracias por enseñarme tanto sobre los kinetoplástidos, sobre el trabajo en equipo, sobre Spotfire... y, sobre todo, gracias por hacer que disfrutara tanto de este trabajo.

Gracias a Juan, Iñaki, Vane, y Carmen por las risas durante tantas horas de p3, habéis hecho que estos años los recuerde con mucho cariño. No os imagináis lo que os echo de menos. Gracias a todos “*los kinetoplastas*” por vuestra ayuda durante este tiempo. De esta época me llevo una Tesis y grandes amigos. Gracias.

Gracias también a Julio, por la confianza que depositó en mi desde el primer momento y por su lucha para conseguir que pudiera seguir disfrutando de este trabajo durante mucho tiempo. Gracias a toda la Kineto DPU por acogerme y hacer posible este proyecto, en especial a Pili y Albane, gracias por encargarnos de toda la parte química del proyecto y por los buenos ratos compartidos. Espero que la vida nos vuelva a juntar, que aún tengo mucho que aprender de vosotros. Gracias a Case McNamara, por estar siempre pendiente de la evolución del proyecto y por su gran ayuda a la hora de preparar la publicación.

Gracias a la Facultad de Farmacia de la UCM por ser mi casa desde hace ya unos años, y en especial, agradecer al departamento de Parasitología esta oportunidad. Alicia, gracias por ser una gran tutora de Tesis, siempre accesible y dispuesta a ayudar.

Gracias a todos los compañeros de GSK, en especial a mis amigos del CIB, a mis *glams*, y sobre todo a Bea, por ser mi primera jefa, por enseñarme tanto, y por estar siempre ahí tanto en lo profesional como en lo personal. Gracias por enseñarme que ser muy seria y muy profesional en el trabajo no está reñido con pasárselo muy bien.

A todos mis amigos, en especial a Víctor, por todos tus consejos sobre cómo afrontar una Tesis, y a Patri, por ser un gran apoyo al hacer este camino juntas. Gracias Marta, tu constancia es una inspiración, quien algo quiere algo le cuesta. Gracias por estar tan cerca estando tan lejos.

Y por supuesto, gracias a mi familia. Papá, Mamá, gracias por darlo todo por mí, por enseñarme que el esfuerzo merece la pena y por ser una inspiración y un modelo a seguir. Mamá, gracias

por descubrirme el mundo de la ciencia. Y Papá, gracias porque, aunque este mundo queda muy lejos para un abogado, siempre has intentado involucrarte en lo que me gusta, interesarte y entender qué son el Chagas y la leishmaniasis. Y Carlos, gracias por enseñarme a relativizar las cosas y por recordarme que, ante todo, estamos en la vida para disfrutar de lo que hacemos. Y, *last but not least*, gracias Fer, por acompañarme en esta aventura como en tantas otras, por insistirme en seguir, por interesarte y por apoyarme en todo momento. Ahora empieza nuestra aventura de verdad y no se me ocurre mejor compañía.

# ÍNDICE



## ÍNDICE

Índice de tablas .....	15
Índice de figuras .....	16
Abreviaturas y Acrónimos.....	19
Summary.....	23
Resumen .....	25
<b>1. Introducción.....</b>	<b>27</b>
<b>1.1. Enfermedades Tropicales Desatendidas .....</b>	<b>29</b>
1.1.1. El impacto de las enfermedades tropicales desatendidas .....	29
1.1.2. Estrategias para el control de las enfermedades tropicales desatendidas	30
1.1.3. Colaboración frente a las enfermedades tropicales desatendidas.....	32
<b>1.2. La clase Kinetoplastea .....</b>	<b>35</b>
<b>1.3. Leishmaniasis.....</b>	<b>36</b>
1.3.1. Antecedentes históricos .....	36
1.3.2. Morfología y ciclo biológico de <i>Leishmania spp.</i> .....	36
1.3.3. Epidemiología y patología .....	38
1.3.4. Diagnóstico .....	42
1.3.5. Tratamiento .....	43
1.3.6. Necesidad de nuevos tratamientos.....	49
<b>1.4. Enfermedad de Chagas .....</b>	<b>51</b>
1.4.1. Antecedentes históricos .....	51
1.4.2. Morfología y ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	51
1.4.3. Epidemiología y patología .....	52
1.4.4. Diagnóstico .....	56
1.4.5. Tratamiento .....	57
1.4.6. Necesidad de nuevos tratamientos.....	61
<b>1.5. Descubrimiento de fármacos .....</b>	<b>62</b>
1.5.1. El proceso de descubrimiento de fármacos: del laboratorio a los pacientes	62
1.5.2. Las etapas iniciales del descubrimiento de fármacos: la identificación de	63
<i>hits</i>	
1.5.3. Criterios de selección de <i>hits</i> para la leishmaniasis visceral y la enfermedad	68
de Chagas.....	
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>69</b>
<b>2.1. Objetivo general .....</b>	<b>71</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>71</b>
2.2.1. <i>Leishmania donovani</i> .....	71

2.2.2.	<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	71
<b>3.</b>	<b><i>Materiales y métodos</i>.....</b>	<b>73</b>
3.1.	Cultivo de las células de mamífero y parásitos .....	75
3.2.	Colección de compuestos .....	78
3.3.	Cascada de progresión de ensayos frente a <i>Leishmania donovani</i> .....	80
3.3.1.	Ensayo axénico .....	80
3.3.2.	Ensayo InMac (Intra Macrófago) .....	82
3.3.3.	Ensayo InMac HS (Intra Macrófago con Horse Serum) .....	85
3.3.4.	Ensayo de citotoxicidad HepG2 .....	86
3.4.	Cascada de progresión de ensayos frente a <i>T. cruzi</i> .....	88
3.4.1.	Ensayo de $\beta$ -galactosidasa .....	88
3.4.2.	Ensayo de Imaging intracelular en H9c2 .....	90
3.4.3.	Ensayo de Rate of Kill .....	92
3.4.4.	Ensayo de Tripomastigotes.....	94
3.5.	Análisis de datos .....	95
3.5.1.	Control de calidad de los ensayos .....	98
3.5.2.	Criterios de selección de <i>hits</i> .....	98
3.6.	Bioseguridad y manejo de muestras biológicas humanas.....	99
<b>4.</b>	<b><i>Resultados y discusión</i>.....</b>	<b>101</b>
4.1.	<i>Screening</i> primario .....	103
4.1.1.	Resultados de <i>screening</i> primario frente a <i>Leishmania donovani</i> .....	103
4.1.2.	Resultados de <i>screening</i> primario frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	107
4.2.	Fase de confirmación.....	111
4.2.1.	Resultados de la fase de confirmación frente a <i>Leishmania donovani</i> ....	111
4.2.2.	Resultados de la fase de confirmación frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	118
4.3.	Fase de dosis respuesta .....	125
4.3.1.	Resultados de la fase de dosis respuesta frente a <i>Leishmania donovani</i> .....	126
4.3.2.	Resultados de la fase de dosis respuesta frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> ....	130
4.4.	Caracterización de los <i>hits</i> y análogos .....	134
4.5.	Estudio de la combinación con benznidazol en el ensayo <i>Rate of Kill</i> .....	151
4.6.	Aportación de esta Tesis Doctoral en el contexto de las estrategias para la búsqueda de nuevos fármacos frente a <i>L. donovani</i> y <i>T. cruzi</i> .....	153
<b>5.</b>	<b><i>Conclusiones</i> .....</b>	<b>157</b>
<b>6.</b>	<b><i>Bibliografía</i> .....</b>	<b>161</b>
<b>7.</b>	<b><i>Anexo</i> .....</b>	<b>175</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los diferentes tipos de leishmaniasis en función de su localización geográfica, manifestación clínica y especie causante. ....	39
Tabla 2. Descripción de las diferentes tipologías de <i>screening</i> para el descubrimiento de fármacos. ....	64
Tabla 3. Comparación de los distintos modelos de screening (Martín, Cantizani, and Peña 2018). ....	66
Tabla 4. Principales criterios de selección de <i>hits</i> para leishmaniasis visceral y enfermedad de Chagas (Don and Ioset 2014). ....	68
Tabla 5. Composición del medio AM para el cultivo axénico de amastigotes de <i>Leishmania donovani</i> . ....	75
Tabla 6. Composición del medio TM para el cultivo de células THP-1. ....	76
Tabla 7. composición del medio para el mantenimiento del cultivo celular de LLC-MK2. ....	76
Tabla 8. composición del medio para el mantenimiento del cultivo celular de H9c2. ...	77
Tabla 9. composición del medio de cultivo de HepG2. ....	77
Tabla 10. Tipo de placa multipocillo y volúmenes de compuesto usados para cada ensayo. ....	78
Tabla 11. Composición del medio de ensayo axénico. ....	81
Tabla 12. Composición del medio de plaqueo para el ensayo InMac. ....	83
Tabla 13. Composición del medio de ensayo de $\beta$ -galactosidasa. ....	88
Tabla 14. Composición del medio de ensayo de Imaging. ....	90
Tabla 15. Valores de $Z'$ media para los diferentes ensayos y <i>outputs</i> frente a <i>L. donovani</i> en fase de confirmación. ....	111
Tabla 16. Valores de $Z'$ media para los diferentes ensayos y <i>outputs</i> frente a <i>T. cruzi</i> en fase de confirmación. ....	118
Tabla 17. Valores de $Z'$ media para los diferentes ensayos y <i>outputs</i> frente a <i>L. donovani</i> en fase de dosis respuesta. ....	126
Tabla 18. Valores de $Z'$ media para los diferentes ensayos frente a <i>T. cruzi</i> en fase de dosis respuesta. ....	130
Tabla 19. Resultados de los <i>hits</i> en los ensayos de <i>L. donovani</i> , <i>T. cruzi</i> y citotoxicidad. ....	137
Tabla 20. Rango de actividad por familias en los ensayos de <i>L. donovani</i> y <i>T. cruzi</i> . ...	141
Tabla 21. Parámetros de <i>Rate of Kill</i> para el compuesto TCOLFS059386, benznidazol, nifurtimox y posaconazol. ....	147
Tabla 22. Compuestos identificados en este <i>screening</i> con actividad ya conocida frente a estos parásitos. ....	149

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de personas que requieren intervención frente a NTDs expresado en miles de millones (2010-2016) (Uniting-to-combat-NTDs 2017).....	29
Figura 2. Documento firmado por los asistentes a la Cumbre de Ginebra en abril de 2017. ....	34
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Leishmania spp.</i> ....	38
Figura 4. Distribución de los casos de leishmaniasis visceral en el mundo (datos de 2015-2016) (Uniting-to-combat-NTDs 2017).....	40
Figura 5. A. Paciente que presenta ulceraciones típicas de leishmaniasis cutánea. B. Paciente que presenta hepatoesplenomegalia a causa de la leishmaniasis visceral. (Fuente: OMS) .....	41
Figura 6. Estructura del estibogluconato sódico. ....	43
Figura 7. Estructura de la anfotericina B. ....	45
Figura 8. Estructura de la miltefosina.....	46
Figura 9. estructura de la paromomicina. ....	48
Figura 10. estructura de la pentamidina. ....	49
Figura 11. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi.</i> ....	52
Figura 12. Distribución de casos de la enfermedad de Chagas reportados a la OMS (datos de 2010) (Uniting-to-combat-NTDs 2017).....	53
Figura 13. Paciente presentando el signo de Romaña característico de la fase aguda de la infección por <i>Trypanosoma cruzi.</i> (Fuente: CDC) .....	54
Figura 14. estructura del benznidazol. ....	58
Figura 15. Estructura del nifurtimox.....	59
Figura 16. Estructura del posaconazol. ....	60
Figura 17. Estructura del fexinidazol. ....	61
Figura 18. Esquema del proceso de descubrimiento y desarrollo de un fármaco.....	63
Figura 19. Distribución de dos poblaciones control (a) y separación entre ambas poblaciones (b). Parámetros estadísticos para el cálculo de Z': media ( $\mu$ ) y desviación estándar ( $\sigma$ ) (Zhang 1999). ....	67
Figura 20. Cascada de progresión de ensayos para el <i>screening</i> de compuestos frente a <i>Leishmania donovani.</i> ....	80
Figura 21. Esquema del protocolo de ensayo axénico de <i>Leishmania donovani.</i> .....	81
Figura 22. Reacción de reducción de la resazurina. ....	82
Figura 23. Esquema del protocolo de ensayo InMac de <i>Leishmania donovani.</i> .....	83
Figura 24. Análisis de datos del ensayo InMac de <i>L. donovani</i> mediante el <i>script</i> desarrollado en Acapella. ....	85
Figura 25. Esquema del protocolo de ensayo de HepG2. ....	86
Figura 26. Reacción de luciferina/luciferasa para la detección de ATP. ....	87
Figura 27. Cascada de progresión de ensayos para el <i>screening</i> de compuestos frente a <i>Trypanosoma cruzi.</i> ....	88

Figura 28. Esquema del protocolo de ensayo de $\beta$ -galactosidasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	89
Figura 29. Reacción catalizada por la $\beta$ -galactosidasa. ....	89
Figura 30. Esquema del protocolo del ensayo de Imaging intracelular de <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	91
Figura 31. Análisis de datos del ensayo de Imaging de <i>T. cruzi</i> mediante el <i>script</i> desarrollado en Acapella. ....	93
Figura 32. Esquema del protocolo del ensayo de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> . ....	94
Figura 33. Gráficas de la cinética <i>Rate of kill</i> de los compuestos nifurtimox (A, B, C) y posaconazol (D, E, F). Representación de los parámetros para el análisis de <i>Rate of kill</i> . .....	97
Figura 34. Representación de las diferentes membranas permeables, mecanismos de transporte a través de las mismas y variaciones de pH a los que se ve expuesto cualquier compuesto en su acción frente a amastigotes intracelulares (Martín, Cantizani, and Peña 2018). ....	104
Figura 35. Distribución de valores de $Z'$ de las placas ensayadas en el <i>screening</i> primario frente a <i>L. donovani</i> . ....	105
Figura 36. Selección de <i>hits</i> del ensayo primario frente a <i>L. donovani</i> . ....	106
Figura 37. Cascada de progresión de los compuestos del <i>screening</i> primario a la fase de confirmación frente a <i>L. donovani</i> . ....	106
Figura 38. Distribución de valores de $Z'$ de las placas ensayadas en el <i>screening</i> primario frente a <i>T. cruzi</i> . ....	109
Figura 39. Selección de <i>hits</i> del ensayo primario frente a <i>T. cruzi</i> . ....	110
Figura 40. Cascada de progresión de los compuestos del <i>screening</i> primario a la fase de confirmación frente a <i>T. cruzi</i> . ....	110
Figura 41. Correlación entre las dos copias de los compuestos repetidos en el ensayo axénico y selección de compuestos a progresar a la fase de dosis respuesta (amarillo). .....	113
Figura 42. Correlación entre las dos copias en el ensayo axénico en fase de confirmación. .....	114
Figura 43. Correlación de los resultados obtenidos para el ensayo axénico en las fases de <i>screening</i> primario y confirmación. ....	114
Figura 44. Selección de compuestos a progresar a la fase de dosis respuesta (amarillo) a partir de los resultados del ensayo InMac. ....	116
Figura 45. Cascada de progresión de los compuestos de la fase de confirmación a la fase de dosis respuesta frente a <i>L. donovani</i> . ....	117
Figura 46. Correlación entre las dos copias de los compuestos repetidos en el ensayo $\beta$ - galactosidasa y selección de compuestos a progresar a la fase de dosis respuesta (azul). .....	120
Figura 47. Correlación entre los ensayos de <i>Imaging</i> AmCel y $\beta$ -galactosidasa. ....	121

Figura 48. Selección de compuestos a progresar a la fase de dosis respuesta (azul) a partir de los resultados del ensayo de tripomastigotes a 72 h. ....	123
Figura 49. Correlación entre los parámetros AmCel (eficacia) y H9c2 (toxicidad) en el ensayo de <i>Imaging</i> en la fase de confirmación. ....	123
Figura 50. Cascada de progresión de los compuestos de la fase de confirmación a la fase de dosis respuesta frente a <i>T. cruzi</i> . ....	124
Figura 51. Representación de la correlación de los valores de pIC <sub>50</sub> para cada compuesto en los parámetros AmMac e InfCel del ensayo InMac. ....	127
Figura 52. Representación de la correlación entre los dos valores de toxicidad: Mac y HepG2. ....	128
Figura 53. Cascada de progresión de los compuestos frente a <i>L. donovani</i> hasta la selección de hits. ....	129
Figura 54. Representación de la correlación de los valores de pIC <sub>50</sub> para cada compuesto en los parámetros AmCel e InfCel del ensayo <i>Imaging</i> . ....	131
Figura 55. Representación de la correlación entre las dos medidas de toxicidad: H9c2 y HepG2. ....	132
Figura 56. Cascada de progresión de los compuestos frente a <i>T. cruzi</i> hasta la selección de hits. ....	133
Figura 57. Estructuras de los <i>hits</i> seleccionados clasificados por familias. ....	135
Figura 58. Estructuras de los <i>singletons</i> seleccionados. ....	136
Figura 59. Distribución de los <i>hits</i> y análogos de las diferentes familias ensayados considerando los outputs de InMac AmMac e <i>Imaging</i> AmCel para <i>L. donovani</i> y <i>T. cruzi</i> , respectivamente. ....	143
Figura 60. Representación esquemática comparativa de los resultados de los diferentes tipos de compuestos en el ensayo de <i>Imaging</i> (A) y en el ensayo de <i>Rate of Kill</i> (B). Adaptado de (De Rycker et al. 2016). ....	145
Figura 61. Representación gráfica de los resultados de <i>Rate of Kill</i> en los parámetros AmCel y H9c2 para el compuesto TCOLFS059386. ....	146
Figura 62. Resumen de los resultados de ambos procesos de <i>screening</i> siguiendo las cascadas de progresión. ....	148
Figura 63. Representación de los resultados del parámetro AmCel en el ensayo de <i>Rate of Kill</i> de la combinación de benznidazol (BNDZ) y TCOLFS008553 (Calibr). ....	151

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>ADME</b>	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
<b>AM</b>	Medio de cultivo de amastigotes axénicos de <i>L. donovani</i>
<b>AmCel</b>	Amastigotes por célula
<b>AmMac</b>	Amastigotes por macrófago
<b>AmpB</b>	Anfotericina B
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>AV/<math>\mu</math></b>	<i>Average</i> o valor medio
<b>BENEFIT</b>	<i>Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis</i>
<b>BRAD</b>	<i>Biological Reagents and Assay Development Department</i>
<b>Calibr</b>	<i>California Institute for Biomedical Research</i>
<b>CCE</b>	<i>Concentration Cidal Effect</i>
<b>CL</b>	Leishmaniasis cutánea
<b>Cmax</b>	Concentración máxima
<b>Cmin</b>	Concentración mínima
<b>CR</b>	Receptor del sistema del complemento
<b>Crtl1</b>	Control 1 o 0% de inhibición
<b>Ctrl2</b>	Control 2 o 100% de inhibición
<b>CYP51</b>	Esterol C14-demetilasa
<b>DALYs</b>	<i>Disability-Adjusted Life Years</i>
<b>DAT</b>	<i>Direct Agglutination Test</i>
<b>DCL</b>	Leishmaniasis cutánea difusa
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNDi</b>	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i>
<b>DR</b>	Dosis Respuesta
<b>DTUs</b>	<i>Discrete Typing Units</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assays</i>
<b>EMA</b>	<i>European Medicines Agency</i>
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>Fc<math>\gamma</math>R</b>	Receptor de la región Fc de inmunoglobulinas G
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FTIH</b>	<i>First Time In Human</i>
<b>GBD</b>	<i>Global Burden of Disease</i>
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>gp63</b>	Glicoproteína gp63 o leishmaniolisina
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>H9c2</b>	Línea celular de cardiomiocitos de rata

<b>HepG2</b>	Línea celular de hepatoma humano
<b>HR</b>	<i>Hit rate</i>
<b>HS</b>	<i>Horse Serum</i>
<b>HTS</b>	<i>High Throughput Screening</i> o cribado de alto rendimiento
<b>i.m.</b>	Intramuscular
<b>i.v.</b>	Intravenoso
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria 50
<b>IFA</b>	<i>Immunofluorescent antibody assay</i>
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>InfCel</b>	Porcentaje de células infectadas
<b>InMac</b>	Intramacrófago (ensayo)
<b>KAtex</b>	<i>Kala azar latex agglutination test</i>
<b>LLC-MK2</b>	Línea celular de células epiteliales de riñón de mono verde
<b>Mac</b>	Macrófagos
<b>Max</b>	Máximo
<b>MCC</b>	<i>Maximum Cidal Concentration</i>
<b>MDA</b>	<i>Mass Drug Administration</i>
<b>ML</b>	Leishmaniasis mucocutánea
<b>MOI</b>	<i>Multiplicity of Infection</i>
<b>N/A</b>	No aplica
<b>NIH-3T3</b>	Línea celular de fibroblastos endoteliales de ratón
<b>NTDs</b>	<i>Neglected Tropical Diseases</i>
<b>OMS/WHO</b>	Organización Mundial de la Salud/ <i>World Health Organization</i>
<b>PAINS</b>	<i>Pan-assay interference compounds</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>pIC<sub>50</sub></b>	Cálculo: - log IC <sub>50</sub>
<b>PKDL</b>	<i>Post-Kala azar Dermal Leishmaniasis</i>
<b>PMA</b>	phorbol 12-myristate 13-acetate
<b>PSG</b>	<i>Promastigote Secretory Gel</i>
<b>qPCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
<b>rK39</b>	<i>Recombinant Kinesin Antigen</i>
<b>RoK</b>	<i>Rate of Kill</i> (ensayo)
<b>RT-PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
<b>SAR</b>	<i>Structure-Activity Relationship</i>
<b>SD/σ</b>	Desviación estándar
<b>SI</b>	<i>Selectivity Index</i>
<b>SS</b>	<i>Single-Shot</i> o concentración única
<b>T</b>	Tiempo
<b>TCOLF</b>	<i>Tres Cantos Open Lab Foundation</i>
<b>THP-1</b>	Línea celular de monocitos leucémicos humanos

<b>TM</b>	Medio de cultivo de células THP-1
<b>UK</b>	Reino Unido
<b>USA</b>	Estados Unidos de América
<b>VIH</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
<b>VL</b>	Leishmaniasis visceral
<b>WT</b>	<i>Wild type</i>
<b>YLDs</b>	<i>Years of Life lived with Disability</i>
<b>YLLs</b>	<i>Years of Life Lost</i>



## SUMMARY

Visceral leishmaniasis (VL) and Chagas disease (CD), caused by kinetoplastid parasites, affect millions of people worldwide and impart a heavy burden against human health. Due to the limited efficacy and toxicity related effects of the existing treatments, there is an urgent need to develop novel therapies with superior efficacy and safety profiles to successfully treat these diseases. There are several strategies available with the aim of finding novel therapies against *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*: the discovery of novel molecules by *de novo* screening of compound libraries, combination therapies, the development of novel formulations for already known drugs, and drug repurposing.

The main focus of this thesis is the strategy based on *de novo* screening of Calibr 150 000 compound library against the parasites *Leishmania donovani*, as a causative agent of VL, and *Trypanosoma cruzi*, that causes CD. With this objective, a progression cascade was designed for each parasite, starting with the higher throughput assays and establishing, later on, the most relevant biological assays as secondary assays.

As primary screening, axenic amastigotes were employed for *L. donovani*, while intracellular amastigotes were used in the case of *T. cruzi*. Later on, and for both parasites, *High Content Imaging* assays were employed, allowing not only the evaluation of efficacy against intracellular amastigotes, but also the evaluation of potential toxicity against host cells (THP-1 for *L. donovani* and H9c2 for *T. cruzi*). For *T. cruzi* screening campaign, an assay against the trypomastigote form of the parasite was also employed. This assay allows the identification of profiles similar to those of current therapies, benznidazole and nifurtimox, and differentiate them from the ones similar to the failed posaconazole.

In addition to the efficacy results obtained based on the *in vitro* assays, physicochemical filters were applied to remove compounds with known toxicity issues and to increase chemical diversity in the process. Additionally, selectivity of the compounds was assessed by a human toxicity assay with HepG2 cell line.

Finally, the selected hits from both progression cascades were characterized against the full available panel of assays for both parasites. As a conclusion, 29 active and selective compounds were identified for *L. donovani* and 78 structures for *T. cruzi*.

Furthermore, and as part of the full biological characterization of the hits, the effect on *T. cruzi* intracellular amastigotes was assessed using the Rate of Kill assay, that allows the detection of

cidal compounds while also giving information about its kinetics. As a conclusion from this study, one compound was identified as cidal.

Finally, within this thesis, another strategy for drug development has been explored: the combination therapies, which have demonstrated great success for other infectious diseases. With that aim, one of the *T. cruzi* hits was evaluated in combination with benznidazole in the Rate of Kill assay, proving that such combination was superior to monotherapy.

The majority of the herein described work has been published recently in *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug resistance* (Roquero et al. 2019). The open access article is available as an annex to this thesis.

## RESUMEN

La leishmaniasis visceral (VL) y la enfermedad de Chagas (CD) son enfermedades causadas por parásitos kinetoplástidos que afectan a millones de personas en el mundo, lo que conlleva un gran impacto en la salud humana. Debido a la eficacia limitada y a los efectos adversos asociados al uso de los tratamientos actuales, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas terapias, con mayor eficacia y mejor perfil de seguridad para lograr tratar estas enfermedades. Existen varias estrategias a la hora de identificar y optimizar nuevos tratamientos frente a *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi*: el descubrimiento de nuevos fármacos mediante el *screening de novo* de librerías, las terapias en combinación, el desarrollo de nuevas formulaciones de principios activos ya conocidos, y el reposicionamiento terapéutico o *drug repurposing*.

En esta Tesis se plantea la estrategia del *screening de novo* a partir de la librería de 150 000 compuestos de Calibr frente a los parásitos *Leishmania donovani*, como agente etiológico causante de la leishmaniasis visceral, y *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas. Para ello se diseñó una cascada de progresión para cada parásito, comenzando con los ensayos de mayor rendimiento y posteriormente estableciendo como ensayos secundarios aquellos de mayor relevancia biológica en el contexto de la enfermedad.

Como ensayos primarios se emplearon amastigotes en cultivo axénico en el caso de *L. donovani*, y amastigotes intracelulares en el caso de *T. cruzi*. Posteriormente, y para ambos parásitos, se emplearon ensayos de *High Content Imaging*, que permiten obtener resultados tanto de eficacia frente a amastigotes intracelulares como de toxicidad frente a las células hospedadoras (THP-1 para *L. donovani* y H9c2 para *T. cruzi*). En el caso de *T. cruzi*, se empleó además un ensayo frente a la forma tripomastigote del parásito, que permite discernir compuestos con perfiles similares a los tratamientos actuales, benznidazol y nifurtimox, de aquellos similares al fallido posaconazol.

Además de los resultados basados en la eficacia *in vitro* de los compuestos frente a los parásitos, se emplearon filtros fisicoquímicos para descartar estructuras de conocida toxicidad y para incrementar la diversidad química en el proceso. Del mismo modo, se obtuvieron resultados de toxicidad frente a la línea celular humana HepG2 para asegurar la selectividad de los compuestos progresados.

Por último, los *hits* seleccionados en ambas cascadas fueron caracterizados frente al panel de ensayos disponibles para ambos parásitos. Como conclusión a este estudio, se identificaron 29 compuestos activos y selectivos frente a *L. donovani* y 78 estructuras frente a *T. cruzi*.

Adicionalmente, y como parte de la completa caracterización biológica de los *hits*, se estudió el efecto de los compuestos sobre los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* en el ensayo de *Rate of Kill*, que permite detectar aquellos compuestos con actividad cida y además evaluar su velocidad de acción al tratarse de un ensayo cinético. Como conclusión se identificó un compuesto cida de entre los seleccionados como activos frente a este parásito.

Finalmente, en el contexto de esta Tesis se ha explorado otra estrategia para la búsqueda de nuevos fármacos frente a *T. cruzi*: las terapias en combinación, que tanto éxito han demostrado en otras patologías infecciosas. Con este objetivo se ensayó uno de los *hits* de *T. cruzi* en combinación con benznidazol en el ensayo de *Rate of Kill*, logrando demostrar superioridad de esta combinación frente a la monoterapia.

La mayor parte de los resultados que se exponen en esta Tesis Doctoral han sido publicados recientemente por la revista *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug resistance*, en formato *open access* (Roquero et al. 2019). La publicación completa se recoge en el anexo de esta Tesis Doctoral.

## 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1. ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS

Las enfermedades tropicales desatendidas o NTDs, por sus siglas en inglés (*Neglected Tropical Diseases*), son un conjunto de 17 enfermedades infecciosas que afectan a más de mil millones de personas en el mundo, principalmente en las regiones de mayor pobreza. La Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye en este grupo las siguientes patologías: dengue, rabia, tracoma causante de ceguera, úlcera de Buruli, pian, lepra, enfermedad de Chagas, enfermedad del sueño, leishmaniasis, cisticercosis, dracunculiasis, equinococosis, filariasis linfática, oncocercosis o ceguera de los ríos, esquistosomiasis, helmintiasis transmitidas por el suelo, e infecciones por trematodos de origen alimentario. Aunque su etiología es muy diversa, muchas de estas enfermedades comparten localización geográfica, lo que permite utilizar las medidas preventivas como la profilaxis y el control de vectores de manera integrada (WHO 2010).

### 1.1.1. EL IMPACTO DE LAS ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS

Además de su localización, estas infecciones tienen en común su impacto en las sociedades más pobres, al tratarse de enfermedades letales o incapacitantes y que, por tanto, afectan a la productividad y el desarrollo de las poblaciones afectadas (Hotez et al. 2016). La OMS estima que en todo el mundo más de mil millones de personas se ven afectadas por estas enfermedades (Figura 1).

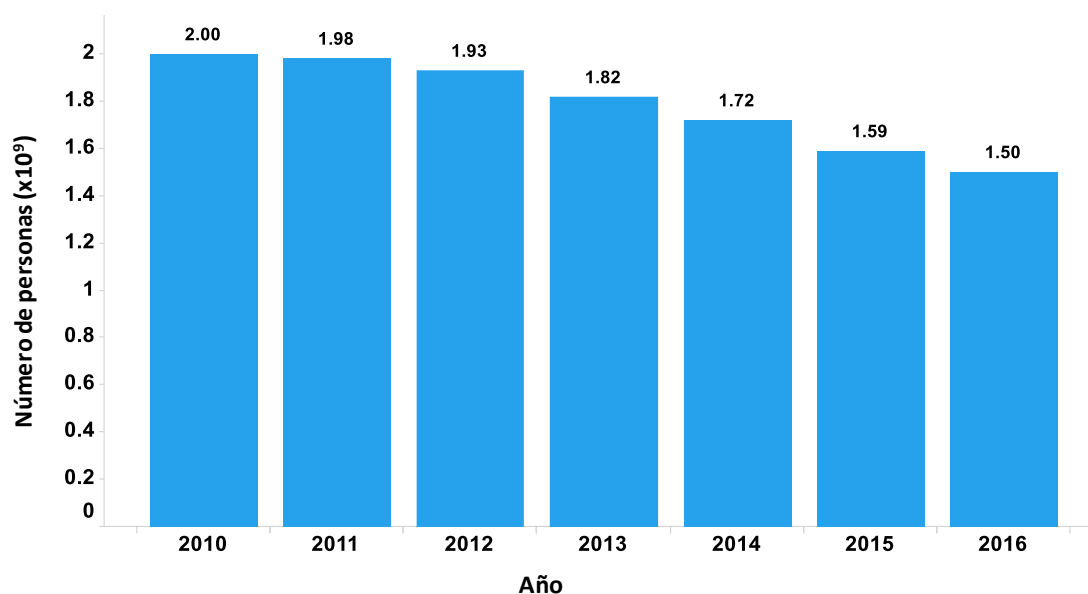


Figura 1. Número de personas que requieren intervención frente a NTDs expresado en miles de millones (2010-2016) (UNITING-TO-COMBAT-NTDS 2017).

Aunque en los últimos años el número de personas que requieren intervención frente a las NTDs ha disminuido considerablemente, gran parte de este éxito se debe al control de la filariasis linfática gracias al tratamiento preventivo de las personas en riesgo (Uniting-to-combat-NTDs 2017).

Para medir el impacto de estas patologías es necesario recurrir a los DALYs o años de vida ajustados por discapacidad (*Disability-Adjusted Life Years*), sin olvidar el impacto provocado por los estigmas sociales que suponen o su impacto económico (Hofstraat and van Brakel 2016, Houweling et al. 2016, Mathers, Ezzati, and Lopez 2007).

En el año 1990 se llevó a cabo el estudio denominado GBD o *Global Burden of Disease*, en el que se definió el término DALY como la suma de las medidas de mortalidad prematura (YLLs o *Years of Life Lost*) y las medidas de discapacidad (YLDs o *Years of Life lived with Disability*). El uso de los DALYs como medida única de la salud de una población ha facilitado los estudios comparativos del impacto provocado por las diferentes enfermedades (Mathers, Ezzati, and Lopez 2007). En 2010, se realizó de nuevo un estudio GBD en el que se cuantificó que el impacto de las 17 NTDs en conjunto corresponde a aproximadamente 26 millones de DALYs (Hotez et al. 2014). No hay que olvidar que en los países afectados por estas enfermedades es muy frecuente la coinfección, por lo que resultaría extremadamente complejo atribuir DALYs a cada patología de forma individual (Engels and Savioli 2006).

#### 1.1.2. ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE LAS ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS

La OMS recomienda el uso de cinco estrategias para la prevención y el control de las NTDs: quimioterapia preventiva, control de casos exhaustivo, control de vectores, provisión de agua potable, saneamiento e higiene, y salud pública veterinaria. Dependiendo de las características de cada enfermedad, cobrará mayor importancia una u otra medida (WHO 2010).

La quimioterapia preventiva es la principal medida de control para la filariasis linfática, la oncocercosis, la esquistosomiasis, el tracoma y las helmintiasis transmitidas por el suelo (Hotez et al. 2016, Albonico et al. 2015). Para que esta estrategia sea posible en el control de las distintas enfermedades se recurre a la administración masiva de fármacos (MDA o *Mass Drug Administration*). Y para ello es necesario disponer de medicamentos seguros y eficaces, de efectos secundarios mínimos, y con formas de administración y posologías sencillas, que se administrarán de forma preventiva a toda la población en riesgo (WHO 2010, Means et al. 2016). Estos programas de administración masiva de fármacos se utilizan en la actualidad para el

tratamiento de forma integrada de estas 5 NTDs utilizando vías de distribución basadas en la comunidad (Smits 2009).

Según el informe de la OMS de 2017, las donaciones de medicamentos como praziquantel, albendazol, mebendazol, ivermectina o dietilcarbamazina han permitido el control de la esquistosomiasis, las helmintiasis transmitidas por el suelo y la filariasis linfática. Con dicho objetivo, en el año 2015 se trataron mil millones de personas para al menos una de estas enfermedades, lo que supone un 62.9% de las personas que lo requieren. La implementación de la quimioterapia preventiva fue impulsada por la colaboración de la industria tras la *London declaration* en 2012 (WHO 2017).

El control de casos exhaustivo es la medida principal para aquellas enfermedades que no disponen de fármacos aptos para su uso en medicina preventiva. Esta estrategia implica el diagnóstico temprano de la patología, el tratamiento del paciente para minimizar la infección, así como el manejo de las posibles complicaciones. El control de casos es fundamental para enfermedades como la úlcera de Buruli, la lepra, el pian, la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana, y las enfermedades objeto de esta Tesis: la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas. En todos los casos citados es fundamental el diagnóstico correcto del paciente antes del tratamiento debido a la toxicidad del mismo (WHO 2010). Por este motivo, es necesario el desarrollo de nuevos medicamentos, más seguros y de posologías más cortas y sencillas, que permitan mejorar la tolerancia y la adhesión al tratamiento, e incluso su utilización como profilaxis (Hotez 2007).

Por otra parte, para prevenir estas enfermedades, es necesario frenar su transmisión, ya sea a través del control de los vectores o mediante la mejora del acceso al agua potable, saneamiento e higiene (WHO 2010). En el caso de las infecciones transmitidas por vectores se recurre al uso de pesticidas, mosquiteras, y la desparasitación de hogares, entre otros (Bates 2015). Mientras que enfermedades como la dracunculiasis o el tracoma se han visto muy beneficiados por la mejora del acceso al agua potable, saneamiento e higiene (Waite et al. 2016). No hay que olvidar que muchas de estas infecciones son zoonosis, por lo que la salud pública veterinaria deberá tenerse muy en cuenta para minimizar su transmisión al ser humano (WHO 2010).

De entre todas las estrategias para el control y la prevención de las NTDs destaca la quimioterapia preventiva por su eficacia (WHO 2017). Para poder aplicar esta medida frente a otras NTDs como la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas es necesario el desarrollo de nuevos medicamentos seguros y eficaces, de efectos adversos mínimos y posologías cortas y sencillas.

### 1.1.3. COLABORACIÓN FRENTE A LAS ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS

Inspirado por el “2020 Roadmap on NTDs” de la OMS, en el año 2012 se firmó la *London declaration* con el convencimiento de que mediante la colaboración sería posible controlar o incluso eliminar al menos 10 de las enfermedades consideradas por la OMS como NTDs para el final de la década: la filariasis linfática, la oncocercosis, la esquistosomiasis, las helmintiasis transmitidas por el suelo, el tracoma, la enfermedad de Chagas, la dracunculiasis, la enfermedad del sueño, la lepra y la leishmaniasis visceral (Uniting-to-combat-NTDs 2012).

En el marco de esta declaración, diversas entidades públicas y privadas, GSK entre ellas, ratificaron los siguientes compromisos:

- Mantener y ampliar los programas de acceso a medicamentos para asegurar el suministro necesario de tratamientos y otras intervenciones para ayudar a controlar la esquistosomiasis, las helmintiasis transmitidas por el suelo, la enfermedad de Chagas, la leishmaniasis visceral y la oncocercosis.
- Promover la Investigación y Desarrollo a través de asociaciones y la provisión de fondos para encontrar tratamientos de nueva generación e intervenciones para las enfermedades olvidadas.
- Mejorar la colaboración y la coordinación sobre las enfermedades tropicales no transmisibles a nivel nacional e internacional a través de organizaciones multilaterales públicas y privadas para trabajar de manera más eficiente y eficaz conjuntamente.
- Habilitar la financiación adecuada con los países endémicos para implementar los programas de NTDs necesarios para alcanzar estos objetivos, apoyados por sistemas de salud fuertes y comprometidos a nivel nacional.
- Proporcionar apoyo técnico, herramientas y recursos para apoyar a los países endémicos de NTDs a evaluar y monitorizar los programas de NTDs.
- Proporcionar actualizaciones periódicas sobre los avances en el logro de los objetivos de 2020 e identificar las deficiencias restantes.

En 2017 estos compromisos han sido reafirmados por los participantes de la cumbre de NTDs de Ginebra (Figura 2).

La *Tres Cantos Open Lab Foundation* (TCOLF), creada en el año 2010 como fundación independiente de GSK, comparte la visión de que, mediante la colaboración y el acceso compartido al conocimiento, resultará más factible y rápido el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de NTDs. Con este objetivo, la TCOLF financia y promueve proyectos

externos y da acceso a los recursos, el conocimiento y las instalaciones de GSK en Tres Cantos para llevarlos a cabo (TCOLF 2010, Ballell et al. 2016).

En el año 2015 se inició un proyecto de colaboración entre la TCOLF y Calibr (*California Institute for Biomedical Research*) cuyos objetivos, procedimientos, resultados y conclusiones se recogen en esta Tesis. Calibr es un instituto independiente sin ánimo de lucro establecido en el año 2012 con el objetivo de acelerar la transición de la investigación básica a nuevos medicamentos para atender necesidades médicas no cubiertas (Calibr 2017).

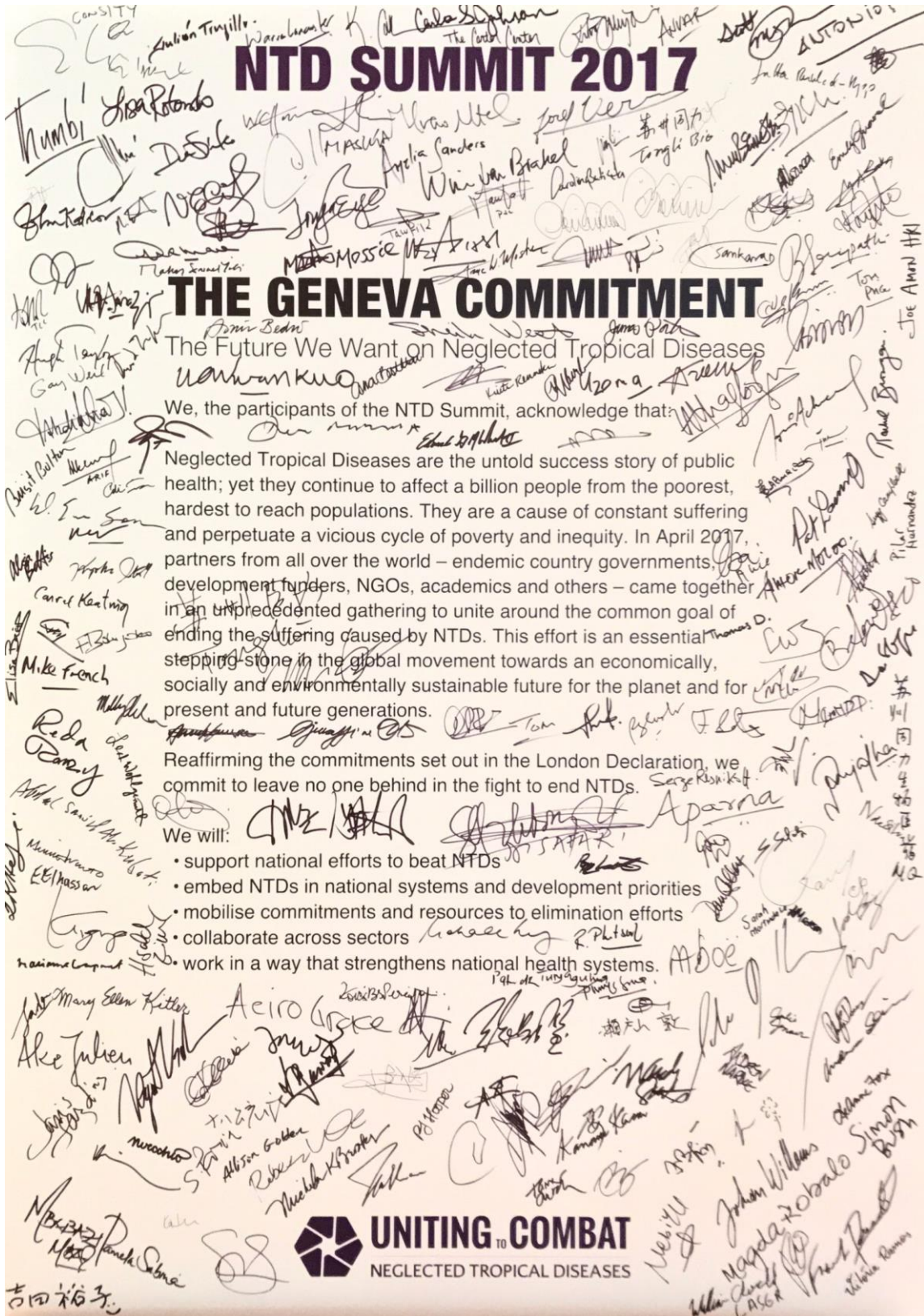


Figura 2. Documento firmado por los asistentes a la Cumbre de Ginebra en abril de 2017.

## 1.2. LA CLASE KINETOPLASTEA

Los kinetoplástidos son una clase de parásitos protozoos flagelados que comprenden los géneros parásitos del hombre *Trypanosoma* y *Leishmania*. Su característica principal es la presencia de una única mitocondria que contiene el kinetoplasto, el DNA mitocondrial, de arquitectura única, que se estructura en maxicírculos y minicírculos (Stuart et al. 2008, Simpson, Stevens, and Lukes 2006).

Los kinetoplástidos se diferencian en las enfermedades que provocan así como en los vectores que los transmiten al ser humano (Stuart et al. 2008). En conjunto, estas infecciones se conocen como TriTryp y afectan a más de 30 millones de personas a nivel mundial (Alcântara et al. 2018).

Hay más de 20 especies del género *Leishmania* causantes de la leishmaniasis en sus diferentes formas clínicas: leishmaniasis visceral, cutánea y otras manifestaciones menos frecuentes de la enfermedad. Estos parásitos son transmitidos entre mamíferos por moscas de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, conocidas también como moscas de la arena (Bates 2015, Stuart et al. 2008, van Griensven and Diro 2012).

La especie *Trypanosoma cruzi* es la causante de la enfermedad de Chagas, transmitida entre los mamíferos mediante insectos hematófagos de la familia *Reduviidae*, género *Triatoma*, conocidos coloquialmente como chinches o vinchucas (Stuart et al. 2008, Barrett and Croft 2012).

Y, por último, dos subespecies de *Trypanosoma brucei* son las causantes de la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana en el ser humano: *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*, transmitidas por la picadura de la mosca tse-tse (*Glossina spp.*) (Castillo 2010, Stuart et al. 2008).

### 1.3. LEISHMANIASIS

#### 1.3.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En el año 1903 el parásito causante del *kala azar* fue descrito por William Boog Leishman (1865-1926) y Charles Donovan (1863-1951) de manera independiente a partir de muestras de pacientes de la India (Dutta 2008). Hasta el descubrimiento del parásito, que se denominó *Leishmania donovani* en honor a sus descubridores, la enfermedad conocida como *kala azar*, descrita por primera vez en 1824, se consideraba un tipo de malaria más virulento y resistente a los tratamientos con quinina (Cox 2002).

En el caso de la leishmaniasis cutánea se han encontrado referencias a su sintomatología en tablas del siglo VII a. C. y textos de Avicenna en el siglo X d. C. El descubrimiento del agente etiológico se atribuye, con cierta controversia al respecto, al americano James Homer Wright (1869-1928) (Cox 2002).

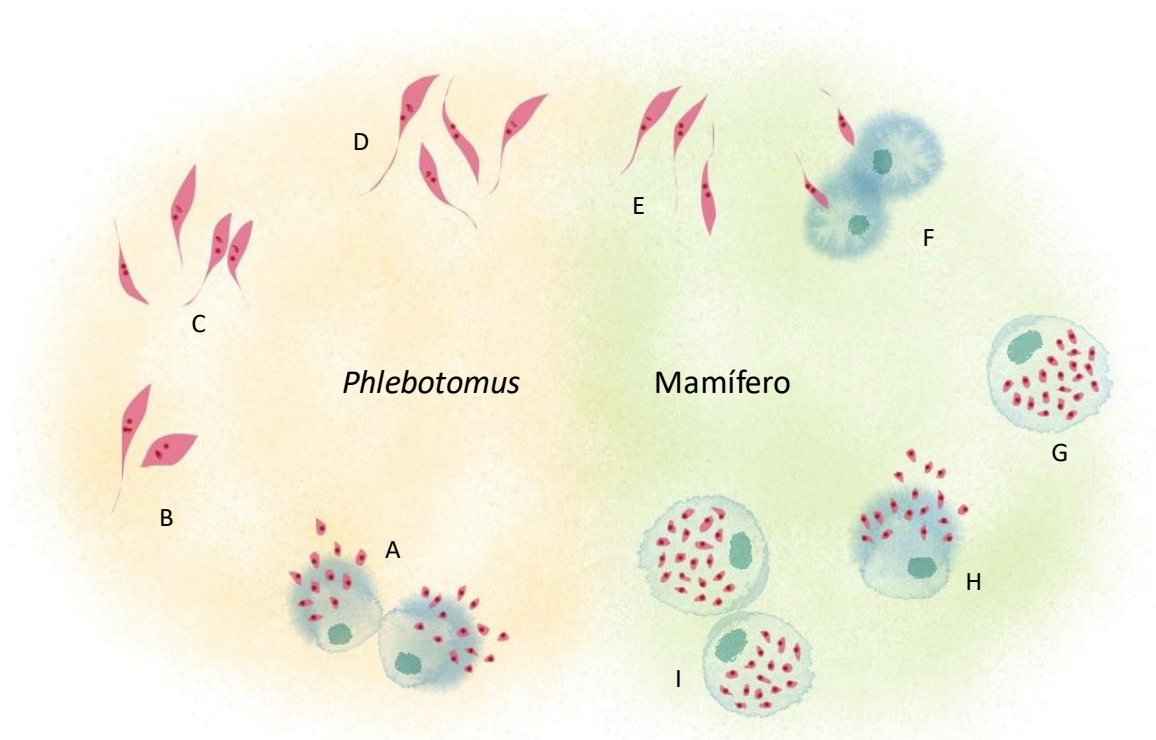
#### 1.3.2. MORFOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO DE *LEISHMANIA SPP.*

Los parásitos del género *Leishmania* tienen un ciclo biológico complejo con dos estadios diferentes. La forma promastigote se encuentra en el vector, las hembras de mosca de la arena o *sandflies*, mientras que la forma amastigote es propia de las etapas que transcurren en el hospedador mamífero (Teixeira et al. 2013, Séguin and Descoteaux 2016). Ambas formas se caracterizan por la presencia de un núcleo, una única mitocondria de gran tamaño con el kinetoplasto, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los glicosomas, un bolsillo flagelar y el cuerpo basal del flagelo formado por microtúbulos. La forma promastigote es extracelular, alargada, con un largo flagelo; mientras que la forma amastigote es intracelular, de forma más redondeada, y posee un flagelo muy corto que habitualmente se sitúa por completo en el interior del bolsillo flagelar (Teixeira et al. 2013). Del mismo modo, los antígenos de superficie varían entre las diferentes morfologías de *Leishmania spp.* y determinan la interacción con el hospedador y la evasión del sistema inmune del mismo (Ueno and Wilson 2012).

El ciclo biológico de este parásito comprende diferentes fases en el vector y el hospedador (Figura 3). Cuando una hembra de mosca de los géneros *Phlebotomus* o *Lutzomyia* pica a un mamífero infectado por el parásito del género *Leishmania* para alimentarse, toma sangre que contiene macrófagos infectados con la forma amastigote del parásito (Figura 3.A). En el intestino de la mosca los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos (Figura 3.B). Estos

promastigotes se dividen por fisión binaria y se adhieren mediante el flagelo al epitelio del intestino del insecto (Figura 3.C). Cuando los parásitos se desprenden del epitelio, migran a la válvula estomoidal, donde se concentran y reinician la división celular. En esta etapa los parásitos segregan PSG (*Promastigote Secretory Gel*), que induce la metacicloogénesis (transformación a promastigotes metacíclicos) (Teixeira et al. 2013) (Figura 3.D). La forma metacíclica es más pequeña que la procíclica, sin embargo, el flagelo es más largo y los parásitos poseen mayor movilidad. Además, la metacicloogénesis implica cambios en la expresión de diferentes proteínas de superficie que hacen que el parásito sea infectivo y capaz de evadir el sistema inmune del mamífero (Ueno and Wilson 2012). Los parásitos acumulados dañan la válvula estomoidal provocando reflujo hacia la probóscide. Cuando la mosca pica de nuevo a un mamífero, los parásitos de la probóscide son inoculados en el hospedador (Teixeira et al. 2013) (Figura 3.E).

Tras la picadura, los promastigotes metacíclicos se encuentran en la piel del hospedador, donde invaden macrófagos y otras células (neutrófilos, células dendríticas y fibroblastos). El parásito se adhiere a la membrana de la célula del hospedador. Esta adhesión está mediada por el reconocimiento de moléculas expuestas en la superficie del parásito como lipofosfoglicanos y la glicoproteína gp63 (una metaloproteasa también llamada leishmaniolisina), que se unen a receptores de superficie de los macrófagos como los receptores del sistema del complemento, receptores de manosa y receptores de fibronectina (Ueno and Wilson 2012, Séguin and Descoteaux 2016). Tras el reconocimiento y la adhesión ocurre la internalización mediante la fagocitosis con pseudópodos (Figura 3.F). El parásito es internalizado en una vacuola conocida como vacuola parasitófora. Una vez en la vacuola, el promastigote metacíclico se transforma en amastigote, donde se multiplica, pudiendo llegar a ocupar todo el espacio del citoplasma (Figura 3.G). Esto conlleva la apoptosis del macrófago infectado (Figura 3.H), quedando los amastigotes en los cuerpos apoptóticos, que serán fagocitados por otros macrófagos (Figura 3.I) o bien serán ingeridos por la mosca durante una picadura (Teixeira et al. 2013, Rodrigues et al. 2016). Al contrario que los promastigotes metacíclicos, los amastigotes no poseen lipofosfoglicanos y se caracterizan por la escasez de gp63 en superficie, por lo que la infección de los macrófagos por amastigotes está mediada por otro tipo de interacciones. Entre ellas, cabe destacar la opsonización del parásito con IgG, que posteriormente son reconocidas por receptores FcγRs de los macrófagos (Ueno and Wilson 2012).



**Figura 3. Ciclo biológico de *Leishmania* spp.**

Durante todo el proceso de infección en el mamífero participan diferentes factores de virulencia del parásito que le permiten sobrevivir. Entre ellos destaca la glicoproteína gp63, que permite evadir la lisis por el sistema del complemento, modula la secreción de citoquinas, inhibe la presentación de antígenos y favorece la respuesta inmune tipo Th2 (Ueno and Wilson 2012, Séguin and Descoteaux 2016).

### 1.3.3. EPIDEMIOLOGÍA Y PATOLOGÍA

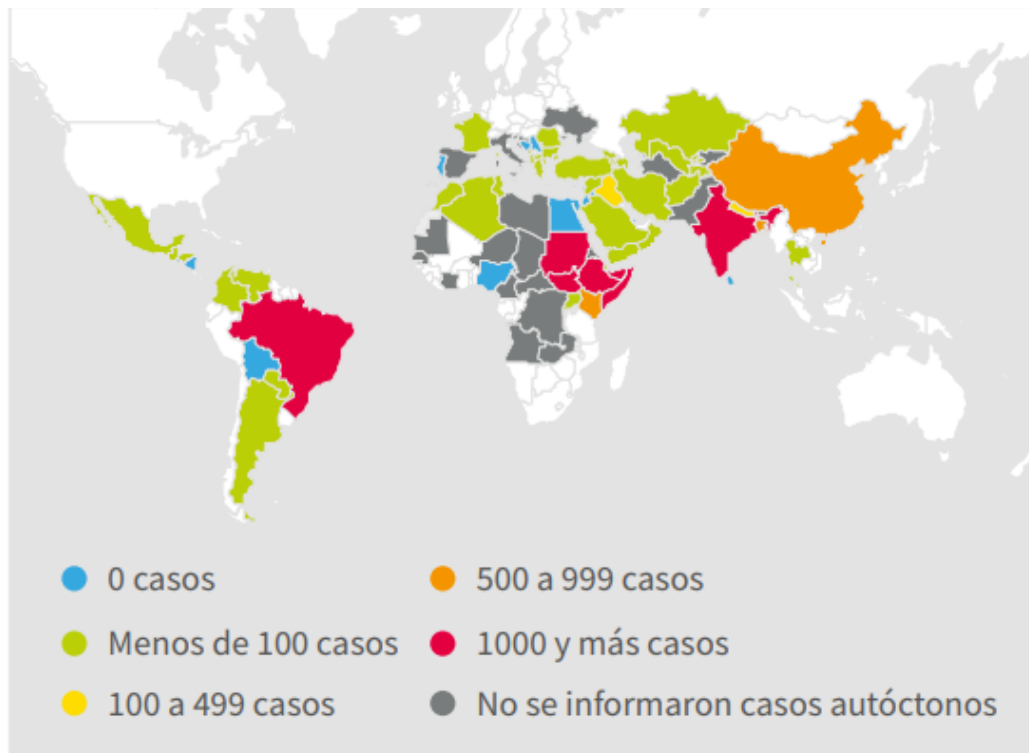
Desde el punto de vista clínico existen cuatro tipos de leishmaniasis: cutánea (CL), cutánea difusa (DCL), mucocutánea (ML) y visceral (VL). La manifestación clínica depende no sólo de la especie causante, sino también de la respuesta inmune del paciente. A su vez, desde un punto de vista geográfico, esta enfermedad se clasifica en leishmaniasis del nuevo y del viejo mundo (Tabla 1) (Kevric, Cappel, and Keeling 2015).

**Tabla 1. Clasificación de los diferentes tipos de leishmaniasis en función de su localización geográfica, manifestación clínica y especie causante.**

<sup>a</sup>Se han asociado a casos de DCL (McCall and McKerrow 2014).

Localización	Manifestación más común	Especie
Viejo mundo	Cutánea	<i>L. major</i>
		<i>L. tropica</i>
		<i>L. aethiopica</i> <sup>a</sup>
	Visceral	<i>L. donovani</i>
		<i>L. infantum</i>
Nuevo mundo	Cutánea	<i>L. mexicana</i> <sup>a</sup>
		<i>L. peruviana</i>
	Cutánea y Mucocutánea	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. guyanensis</i>
		<i>L. panamensis</i>
		<i>L. amazonensis</i>
	Visceral	<i>L. chagasi</i>

Se calcula que a nivel mundial aproximadamente 12 millones de personas sufren leishmaniasis y 350 millones están en riesgo de contraer la enfermedad. Se estima que cada año hay 0.2 – 0.4 millones de casos nuevos de leishmaniasis visceral y 0.7 – 1.2 millones de leishmaniasis cutánea (Georgiadou, Makaritsis, and Dalekos 2015, Alvar et al. 2012). La leishmaniasis visceral causa 40 000 muertes al año a nivel mundial (Ready 2014). El 90% de los casos de VL se registran en únicamente seis países: Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Sudán y Sudán del Sur (Figura 4). El 75% de los casos de CL se localizan en 10 países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Etiopía, Irán, Perú, Sudán y Siria (Georgiadou, Makaritsis, and Dalekos 2015, Alvar et al. 2012).



**Figura 4. Distribución de los casos de leishmaniasis visceral en el mundo (datos de 2015-2016) (Uniting-to-combat-NTDs 2017).**

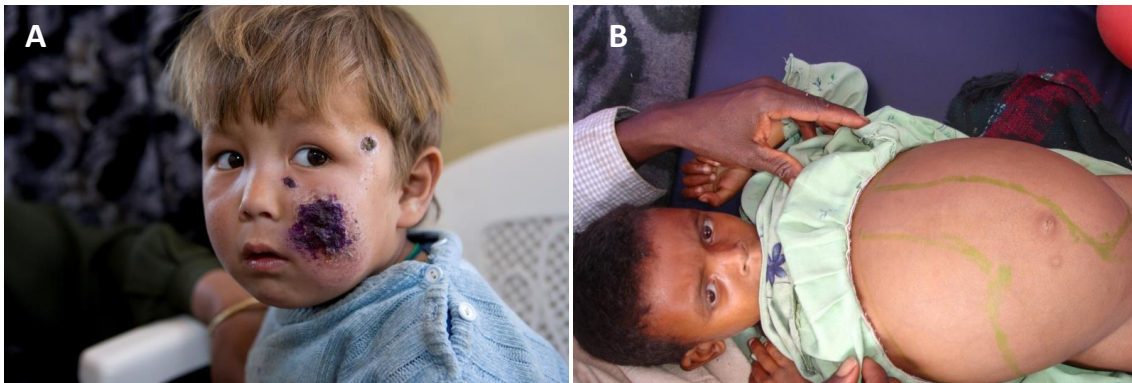
Es común que la leishmaniasis cutánea se presente de forma subclínica y cure de forma espontánea. A pesar de ello, estos pacientes, denominados portadores sanos, pueden transmitir la enfermedad (Andrade-Narvaez et al. 2016). Sin embargo, en condiciones en las que la respuesta inmune del paciente no es adecuada, el parásito prolifera y se observan lesiones en la piel. Independientemente de la especie causante de la enfermedad, las lesiones siempre comienzan como pápulas en la zona de la inoculación del parásito. Posteriormente esta pápula puede evolucionar y dar lugar a ulceraciones en la piel, generalmente indoloras, pero muy susceptibles a infecciones por bacterias y hongos (Figura 5. A). Tras esta primera manifestación pueden aparecer lesiones ulcerosas en otras zonas de la piel que generalmente dejan cicatriz tras la curación del paciente (Kevric, Cappel, and Keeling 2015).

La leishmaniasis cutánea difusa se caracteriza por la presencia de lesiones coloreadas en forma de pápulas o nódulos, generalmente diseminadas en el tronco y la cara. A diferencia de la leishmaniasis cutánea, estas lesiones no tienden a ulcerarse (Kevric, Cappel, and Keeling 2015, Hashiguchi et al. 2016).

Es poco frecuente, pero la leishmaniasis cutánea del nuevo mundo puede progresar al cabo de uno o dos años y provocar la leishmaniasis mucocutánea. Esta manifestación clínica de la

enfermedad conlleva la aparición de lesiones mutiladoras en tejido mucoso, principalmente nasal, bucal y anejos (Kevric, Cappel, and Keeling 2015).

La leishmaniasis visceral, también conocida como *kala azar*, puede manifestarse meses o años tras la picadura y cursa con síntomas como fiebre, hiperpigmentación de la piel, pérdida de peso, anorexia, debilidad, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, epistaxis y retraso del crecimiento en los niños (Figura 5. B). Sin tratamiento es letal en aproximadamente dos años (Kevric, Cappel, and Keeling 2015, Ready 2014). La leishmaniasis visceral es producida por las especies del complejo *L. donovani*: *L. donovani* y *L. infantum* (llamado *L. chagasi* en América). En pacientes coinfectados con VIH las infecciones producidas por otras especies, de manifestación típicamente cutánea, tienden a visceralizar (van Griensven and Diro 2012).



**Figura 5. A. Paciente que presenta ulceraciones típicas de leishmaniasis cutánea. B. Paciente que presenta hepatoesplenomegalia a causa de la leishmaniasis visceral. (Fuente: OMS)**

La leishmaniasis visceral producida por *L. infantum* es generalmente de transmisión zoonótica, siendo el perro el principal reservorio. Este tipo de leishmaniasis es frecuente en la región mediterránea, China, Oriente Medio y Sudamérica y afecta generalmente a niños. A nivel global, el tipo más frecuente de VL es la forma antroponótica, típica de *L. donovani* y prevalente en el Este de África, Bangladesh, India y Nepal. Este tipo de VL afecta a poblaciones de todas las edades (van Griensven and Diro 2012).

En ciertos casos, tras el tratamiento de la leishmaniasis visceral por *L. donovani*, puede aparecer la llamada leishmaniasis dérmica post-*kala azar* (PKDL), que cursa con máculas hipopigmentadas, pápulas y nódulos diseminados por todo el cuerpo, aunque con mucha frecuencia en la cara (Kevric, Cappel, and Keeling 2015, Ready 2014, Trindade et al. 2015). Esta manifestación es muy frecuente en Sudán (50 – 60%), donde suele curar de forma espontánea. Por el contrario, en la India es menos frecuente (5 – 10%), pero de peor pronóstico (van Griensven and Diro 2012).

#### 1.3.4. DIAGNÓSTICO

Se necesitan test diagnósticos con elevada sensibilidad (>95%) para diferenciar entre enfermedad aguda, infección asintomática, y pacientes en remisión o curados, ya que la leishmaniasis visceral es letal sin tratamiento, y los medicamentos disponibles son demasiado tóxicos como para utilizarlos en pacientes asintomáticos (Mondal, Bhattacharya, and Ali 2010).

Para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral existen cuatro tipos de técnicas: clínicas, parasitológicas, inmunológicas y moleculares (Ejazi and Ali 2013, Georgiadou, Makaritsis, and Dalekos 2015).

Las técnicas clínicas consisten en la evaluación de los signos y síntomas ya descritos. Hay que tener en cuenta que muchos de estos síntomas pueden confundirse con otras enfermedades como malaria, fiebre tifoidea, filariasis, o tuberculosis. Y en casos de coinfección con VIH, la sintomatología típica puede cambiar. Por todo ello, siempre será necesario el uso de otras técnicas para confirmar el diagnóstico y definir el tratamiento (Ejazi and Ali 2013).

Las técnicas parasitológicas son aquellas que permiten la detección visual del parásito, como la evaluación microscópica de muestras tisulares (bazo, médula ósea y nódulos linfáticos) de pacientes. Este tipo de diagnóstico, que implica el aspirado tisular, es sensible, pero no lo suficiente como para ser utilizado como método único de diagnóstico. Además, requiere de personal experto para su ejecución al tratarse de técnicas invasivas (Ejazi and Ali 2013).

Por otro lado, las técnicas inmunológicas se basan en la detección de antígenos o anticuerpos frente a *Leishmania* en sangre. La detección de antígenos es más específica que la detección de anticuerpos. Sin embargo, en las etapas tempranas de infección, es un método poco sensible. Los métodos de diagnóstico inmunológico clásicos son ELISA y DAT (Ejazi and Ali 2013, Mondal, Bhattacharya, and Ali 2010). Tras la curación de la enfermedad, estos test continúan dando un resultado positivo durante meses o años, por lo que no pueden ser utilizados como medida de evaluación de la eficacia de un tratamiento.

Otro de los test inmunológicos más empleados es la tira reactiva de rK39, que a diferencia de los anteriores sí que permite el seguimiento de una infección activa, y por tanto, la evaluación de la eficacia del tratamiento (Georgiadou, Makaritsis, and Dalekos 2015). El test KAtex se basa en la detección de antígenos en orina y sus principales ventajas son la sencillez de uso y la rapidez. Sin embargo, su baja sensibilidad limita su utilidad (Sundar Shyam 2005).

Las técnicas de diagnóstico molecular más importantes son la detección del parásito por PCR. Además, la técnica RT-PCR puede usarse para determinar la carga parasitaria, no sólo como método de diagnóstico, sino también como medida de la prognosis. Hay que tener en cuenta que las técnicas moleculares permiten diferenciar la especie de *Leishmania* causante de la enfermedad, y con ello, determinar mejor el tratamiento a emplear (Ejazi and Ali 2013, Salam et al. 2010).

### 1.3.5. TRATAMIENTO

Sin tratamiento, la tasa de mortalidad de la leishmaniasis visceral es del 90%, generalmente asociada a complicaciones de tipo hemorrágico o infeccioso (Georgiadou, Makaritsis, and Dalekos 2015). El tratamiento de la leishmaniasis visceral es complejo debido a la susceptibilidad variable a los fármacos de las distintas especies del género *Leishmania*, así como la diferente eficacia de los medicamentos según la región geográfica. Tanto es así, que la eficacia de los fármacos debe ser valorada en cada una de las zonas endémicas (Dorlo et al. 2012). El arsenal terapéutico frente a la leishmaniasis visceral lo componen actualmente cinco fármacos: antimoniales, anfotericina B, miltefosina, paromomicina y pentamidina (No 2016).

#### Antimoniales pentavalentes

Los antimoniales pentavalentes utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis son el antimonio de meglumina y el estibogluconato sódico (Figura 6) (No 2016). El antimonio pentavalente ( $Sb^V$ ) se utilizó por primera vez en el año 1912, y ha sido empleado como primera línea de tratamiento frente a la leishmaniasis durante 70 años (Mondal, Bhattacharya, and Ali 2010).

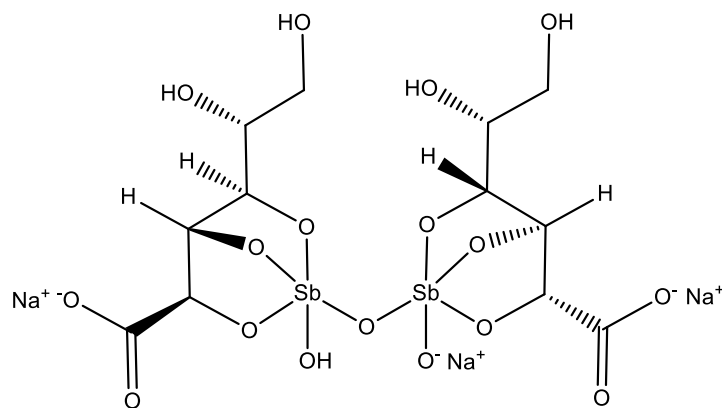


Figura 6. Estructura del estibogluconato sódico.

La absorción por vía oral es muy limitada, por lo que requiere administración parenteral (i.m. o i.v.). La administración intramuscular es extremadamente dolorosa, y la vía intravenosa requiere de personal especializado. La dosis recomendada por la OMS desde 1982 es de 20 mg/kg, una vez al día, durante 20 – 30 días (40 – 60 días en caso de recidivas), con lo que se obtienen tasas de curación del 95%, excepto en regiones de la India y Nepal donde se ha detectado resistencia a los antimoniales desde mediados de los años 90. Los principales efectos adversos comprenden cardiotoxicidad y pancreatitis, que pueden llegar a provocar la muerte. También son frecuentes la hepatotoxicidad y el daño renal. La monitorización de estas reacciones adversas es recomendable, especialmente en pacientes con coinfección por VIH (Georgiadou, Makaritsis, and Dalekos 2015, Ejazi and Ali 2013, Mondal, Bhattacharya, and Ali 2010). Los niños menores de dos años y adultos mayores de 45 años en estadios avanzados de la enfermedad o con malnutrición severa, presentan un riesgo mayor de muerte por el tratamiento con antimoniales debido a su toxicidad, falta de eficacia, y complicaciones asociadas a la enfermedad (Chappuis et al. 2007).

El mecanismo de acción de los antimoniales pentavalentes no se conoce con exactitud. En la actualidad se plantean dos hipótesis. El primer modelo considera que la actividad antiparasitaria se debe a la conversión del  $Sb^V$  a  $Sb^{III}$ , mientras que la segunda hipótesis defiende que el  $Sb^V$  es la especie activa (No 2016).

De acuerdo con el primer modelo, el  $Sb^V$  accede al interior de las células infectadas por *Leishmania* y al interior de los amastigotes, donde es expuesto a los tioles del lisosoma y a la tripanotona parasitaria, lo que conlleva su transformación en  $Sb^{III}$ . Este proceso de conversión es más eficiente *in vitro* a pH bajo, condición en la que se encuentran los amastigotes intracelulares. Una vez reducido, el  $Sb^{III}$  inactiva la tripanotona, uno de los factores de virulencia de este parásito, que permite que sobreviva al estrés oxidativo. Del mismo modo, el  $Sb^{III}$  también inhibe la tripanotona reductasa, enzima que permite el reciclado de la tripanotona oxidada. Los aislados clínicos de cepas de *Leishmania* resistentes a antimoniales muestran sobreexpresión de la tripanotona reductasa (No 2016).

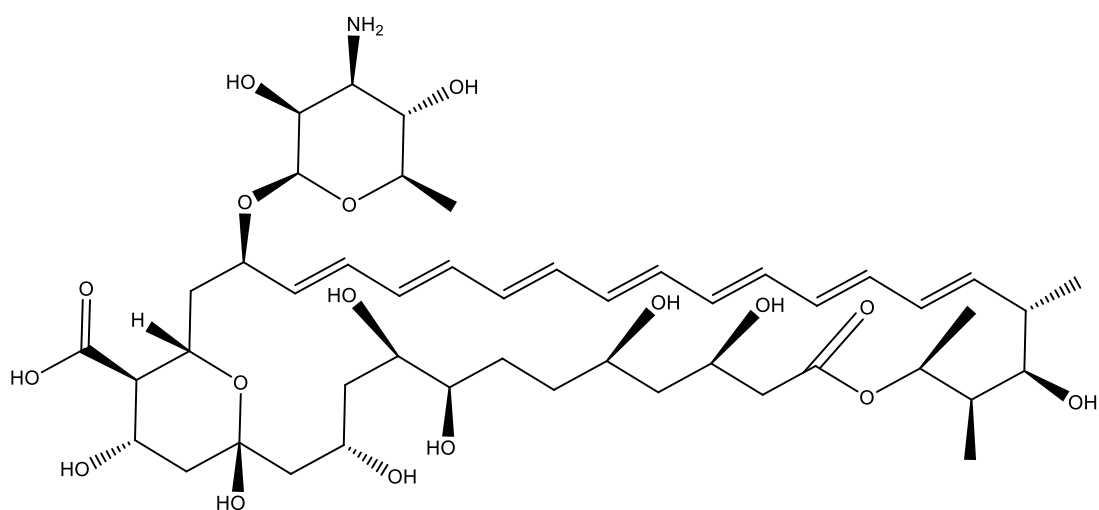
El segundo modelo considera que el  $Sb^V$  inhibe la topoisomerasa I del parásito y se une a ribonucleósidos a pH bajo. Estas acciones conllevan una reducción del ATP y GTP del parásito (No 2016).

La resistencia a los antimoniales pentavalentes está muy extendida, especialmente en la región de Bihar en la India. Los posibles mecanismos de resistencia no se conocen con exactitud, si bien existen estudios que sugieren que podría estar implicada la bomba de exclusión de conjugados

metal-tiol. Por otra parte, se ha observado que en las cepas resistentes a estos fármacos existe una menor expresión de AQP1, lo que disminuye los niveles de entrada de antimonio en la célula (Kaur and Rajput 2014).

### Anfotericina B

La anfotericina B (AmpB) es un antibiótico macrólido de origen natural aislado por primera vez a partir de *Streptomyces noclosus* en 1955 (Figura 7). Su uso más común es en el tratamiento de infecciones fúngicas producidas por *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* (No 2016). La anfotericina B deoxicolato ha sido utilizada como tratamiento de segunda línea de la leishmaniasis visceral durante las últimas 3 décadas, siendo incluso la primera elección en regiones con resistencias a los antimoniales (Alvar, Croft, and Olliaro 2006).



**Figura 7. Estructura de la anfotericina B.**

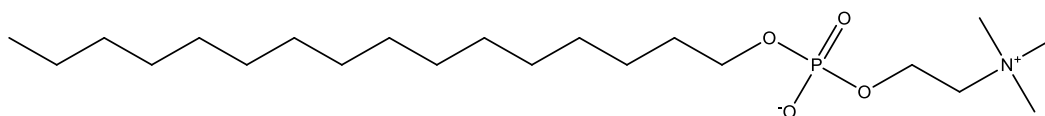
Sin embargo, el uso de la anfotericina B está limitado por su nefrotoxicidad y hematotoxicidad. Para minimizar estos efectos secundarios se están estudiando diferentes formulaciones de este principio activo. En la actualidad, para el tratamiento de la leishmaniasis visceral se utiliza la formulación liposomal de AmpB por vía intravenosa, en una sola dosis. La tasa de curación en estas condiciones es del 95%. Esta formulación desarrollada en los años 80 tiene mejor perfil farmacocinético y toxicológico, sin embargo, su precio dificulta su uso en países en vías de desarrollo (No 2016, Alvar, Croft, and Olliaro 2006). Para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea se están estudiando formulaciones tópicas en gel de AmpB ciclodextrina metil celulosa con los que se obtienen buenos resultados tanto a nivel de seguridad como de eficacia para el tratamiento de infecciones cutáneas fúngicas o causadas por *Leishmania spp.* (Ruiz et al. 2014).

La AmpB se une al ergosterol del parásito mediante interacciones de tipo hidrofóbico. Su mecanismo de acción más estudiado y aceptado es la formación de poros en la membrana parasitaria, que impiden el control del flujo de iones, glucosa y otros componentes a través de la membrana (No 2016).

La resistencia a AmpB en *Leishmania spp.* no es común, aunque se han descrito casos en la India. En cepas resistentes se han encontrado alteraciones en la composición de la membrana a nivel lipídico y niveles intracelulares más bajos del fármaco en comparación con las cepas sensibles. Otros estudios han observado sobreexpresión de bombas de exclusión (Kaur and Rajput 2014).

### Miltefosina

La miltefosina (Figura 8) es una alquil-fosfocolina que se desarrolló inicialmente como antineoplásico en la década de los 80 para el tratamiento de la metástasis cutánea de cáncer de mama y otros tumores sólidos. En la misma época se descubrió su eficacia *in vitro* frente a la leishmaniasis y en el año 2002 se registró para dicha aplicación, convirtiéndose así en el primer y, de momento, único tratamiento por vía oral disponible para esta enfermedad (No 2016, Ejazi and Ali 2013, Dorlo et al. 2012).



**Figura 8. Estructura de la miltefosina.**

La dosis recomendada diaria es de 2.5 mg/kg durante 28 días tanto en adultos como en niños. Sin embargo, en la India, debido a la reducida disponibilidad de las cápsulas de 10 mg en comparación con las formulaciones de 50 mg, se recomienda una pauta posológica general de 50 mg/día en pacientes con peso menor a 25 kg y de 100 mg/día para pesos a partir de 25 kg (Ejazi and Ali 2013, Dorlo et al. 2012). En el tratamiento de pacientes adultos en la India durante la fase III de ensayos clínicos se consiguió una tasa de curación del 94%, siendo eficaz incluso en los casos resistentes a antimoniales (Mondal, Bhattacharya, and Ali 2010).

Sus principales efectos secundarios no son graves, generalmente los pacientes pueden presentar síntomas gastrointestinales como anorexia, diarrea, náuseas y vómitos. Con poca frecuencia aparecen efectos secundarios de mayor gravedad como ictericia, elevación de transaminasas y creatinina (Pandey et al. 2016). La miltefosina es teratogénica en animales, si bien no hay datos que demuestren teratogenicidad en mujeres, se recomienda evitar su uso durante el embarazo y la lactancia, así como el uso de medidas anticonceptivas en mujeres en

edad fértil durante el tratamiento y hasta 6 meses después de terminarlo (Mondal, Bhattacharya, and Ali 2010, Pandey et al. 2016). Del mismo modo, su uso está contraindicado en niños menores de dos años ya que la miltefosina se deposita en los huesos (Pandey et al. 2016).

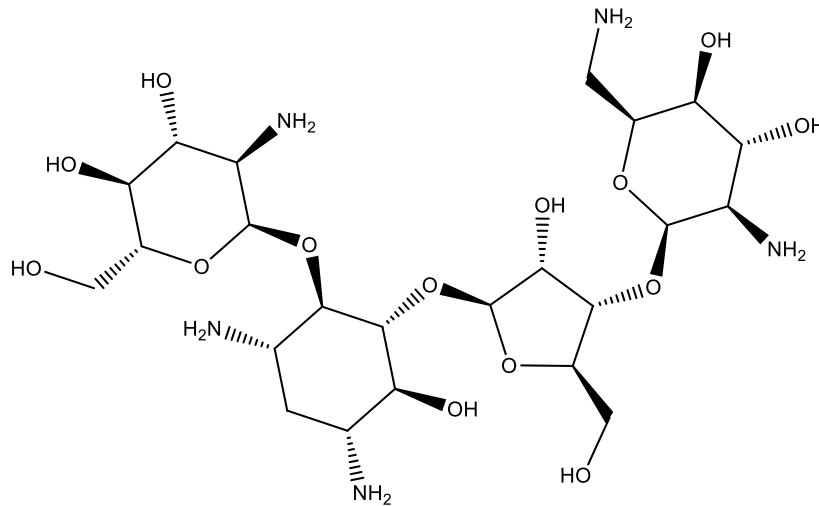
Al tratarse de un tratamiento por vía oral, no requiere de asistencia sanitaria para su administración, que puede realizarse sin monitorización hospitalaria. Su alta eficacia y fácil administración suponen una clara ventaja en comparación con otros tratamientos disponibles. Paradójicamente, esto conlleva también una gran desventaja, ya que, al estar su dispensación y uso menos controlado, se favorecen los malos usos del medicamento, que se traducen en mayor toxicidad e incluso mayor tasa de abandono. La prolongada vida media (150 – 200 h) de la miltefosina favorece la aparición de resistencias, especialmente durante pautas incompletas o en monoterapia.

A nivel de laboratorio se han podido seleccionar promastigotes de *L. donovani* resistentes a miltefosina. Esta resistencia ha sido relacionada con la disminución del transporte del fármaco a través de la membrana plasmática, mediada por el complejo LdMT/LdRos3. La proteína LdMT es una ATPasa tipo P de la subfamilia de aminofosfolípido translocasas, mientras que LdRos3 se considera la putativa subunidad  $\beta$  de dicha ATPasa, esencial para el correcto funcionamiento de la misma (Pérez-Victoria et al. 2003, Pérez-Victoria et al. 2006).

El mecanismo de acción de la miltefosina no se conoce con exactitud, y la abundancia de hipótesis y estudios al respecto sugieren la existencia de diversos mecanismos de acción. Tanto en sus aplicaciones antiparasitarias como antineoplásicas, la acción de esta molécula ha sido relacionada fundamentalmente con la regulación de la apoptosis y la interrupción de las vías de señalización intracelular mediadas por lípidos (Dorlo et al. 2012).

### Paromomicina

La paromomicina (Figura 9) es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro aislado a partir de *Streptomyces krestomuceticus* con utilidad en el tratamiento de infecciones intestinales. Su actividad frente a parásitos del género *Leishmania* se descubrió en la década de los 60 (No 2016).



**Figura 9. Estructura de la paromomicina.**

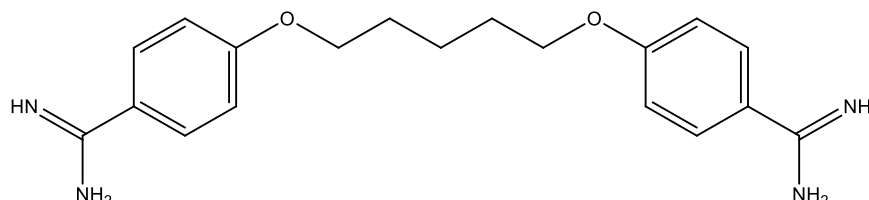
La paromomicina para el tratamiento de la leishmaniasis visceral se administra por vía intramuscular ya que su biodisponibilidad oral es muy baja. La posología recomendada en la India es de 11 mg/kg diariamente durante 21 días, sin embargo, en África esta dosis demostró ser insuficiente (Ejazi and Ali 2013). En la India ha demostrado tasas de curación de en torno al 94%. Se han desarrollado formulaciones tópicas para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea que en ensayos clínicos demostraron una eficacia del 82% en monoterapia. Además de la baja biodisponibilidad, la paromomicina presenta como inconveniente el fácil desarrollo de resistencias. Si bien no se han hallado aislados clínicos resistentes a este fármaco, se han generado cepas de *L. donovani* resistentes a paromomicina sin dificultad en el laboratorio (No 2016). Como ventajas destaca su bajo coste y la levedad de sus principales efectos secundarios, como la ototoxicidad reversible, la elevación de las transaminasas y el dolor en el lugar de inyección (Chappuis et al. 2007).

Existen diversas teorías acerca del mecanismo de acción de la paromomicina: variación de la fluidez de la membrana plasmática, alteración del potencial de membrana mitocondrial, y la más aceptada, alteración de la síntesis proteica. Por los estudios en bacterias se conoce la acción de los antibióticos aminoglucósidos sobre los ribosomas, y, por consiguiente, sobre la síntesis de proteínas. En el caso de las bacterias, la paromomicina se une a la subunidad 30S del ribosoma, lo que se traduce en la inhibición de la síntesis proteica (No 2016).

Si bien esta unión al ribosoma no ha sido descrita para *Leishmania spp.*, si se ha podido comprobar la sobreexpresión de proteínas ribosomales en cepas resistentes a la paromomicina en comparación con cepas salvajes o *wild type* (WT) (No 2016).

## Pentamidina

La pentamidina (Figura 10) es una diamidina aromática con actividad antiprotozoaria descubierta en la década de los años 30 (No 2016, Dorlo et al. 2012). Se ha utilizado como segunda línea de tratamiento en casos de resistencia a los antimoniales en la India (Mondal, Bhattacharya, and Ali 2010).



**Figura 10. Estructura de la pentamidina.**

La pauta posológica de la pentamidina para el tratamiento de la leishmaniasis visceral consiste en la administración de 4 mg/kg tres veces en semana hasta eliminación de la parasitemia. La eficacia de la pentamidina ha ido disminuyendo a niveles cercanos al 70%. Además, el uso de pentamidina se ha asociado a importantes efectos secundarios como la diabetes mellitus insulino-dependiente, shock, hipoglucemia e incluso muerte. Estas circunstancias, junto con el coste del tratamiento y la aparición de resistencias, hacen que la pentamidina se encuentre prácticamente en desuso para el tratamiento de la leishmaniasis visceral en monoterapia. Sin embargo, existen estudios que demuestran su eficacia en la prevención de recaídas en pacientes coinfectados con VIH en combinación con alopurinol y administrado una vez al mes (Mondal, Bhattacharya, and Ali 2010, Ejazi and Ali 2013).

Aunque el mecanismo de acción de la pentamidina no se conoce con exactitud, se cree que promueve la apoptosis mediante la alteración del potencial de membrana mitocondrial afectando a la cadena respiratoria, o bien inhibiendo la replicación del DNA del kinetoplasto (No 2016).

### 1.3.6. NECESIDAD DE NUEVOS TRATAMIENTOS

Los fármacos disponibles en la actualidad para el tratamiento de la leishmaniasis visceral implican diferentes formas de toxicidad. Además, algunos de ellos quedan obsoletos por la emergencia de resistencias (No 2016).

Idealmente, los fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis deberían ser altamente eficaces, seguros, sin resistencias, de posologías cortas y sencillas, preferiblemente de

administración por vía oral y de precio asequible (Mondal, Bhattacharya, and Ali 2010, Alvar, Croft, and Olliaro 2006).

En ausencia de una vacuna preventiva, fármacos de estas características, con un perfil de seguridad excelente, podrían ser usados como herramienta para la erradicación de la leishmaniasis siguiendo estrategias de quimioterapia preventiva como ocurre en el caso de otras NTDs (Alvar and Arana 2017).

## 1.4. ENFERMEDAD DE CHAGAS

### 1.4.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

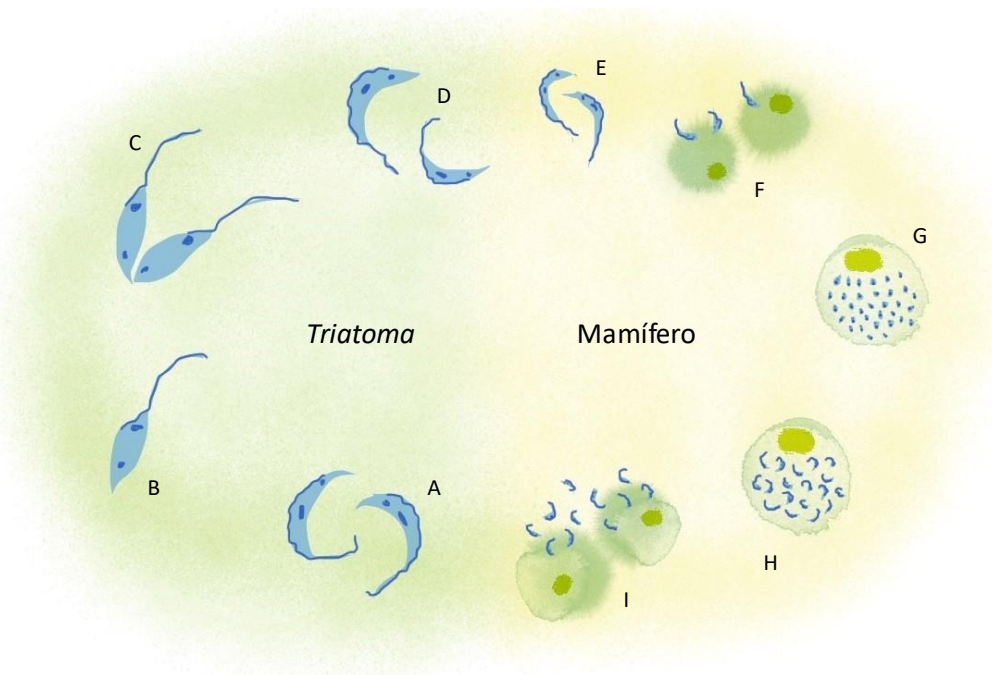
La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana está causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, descubierto en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas (1879-1934). En su publicación original describe en detalle el ciclo de transmisión del parásito y las manifestaciones clínicas agudas propias de la enfermedad. Sin embargo, se tiene constancia de casos de tripanosomiasis americana anteriores a su descubrimiento: se ha encontrado DNA del parásito en momias andinas precolombinas de hace 9000 años y se cree que Charles Darwin contrajo la enfermedad en su expedición a América del Sur en el año 1835 (Rassi, Rassi, and Marin-Neto 2010, Guarner 2019, Echeverria and Morillo 2019). Tras su descubrimiento, se emplearon sin éxito clínico tratamientos como los derivados de arsénico, cloruro de mercurio, fucsina o tartar emético (Custodio Leite 2019).

### 1.4.2. MORFOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

El parásito *Trypanosoma cruzi* tiene un ciclo biológico complejo con tres estadios diferentes, que alternan formas no infectivas (replicativas) y formas infectivas (no replicativas) (Goldenberg and Avila 2011). Las formas amastigote y epimastigote son proliferativas, características del hospedador vertebrado e invertebrado respectivamente. La forma tripomastigote es altamente infectiva, se genera a partir de las formas proliferativas, y se encuentra tanto en la sangre del hospedador vertebrado como en las regiones posteriores del tracto digestivo del vector (Teixeira et al. 2012).

El ciclo biológico de este parásito comprende diferentes fases en el vector y en el hospedador (Figura 11). Cuando un insecto del género *Triatoma* pica a un mamífero infectado por el parásito *Trypanosoma cruzi* para alimentarse, toma sangre que contiene tripomastigotes (Figura 11.A). En el estómago del insecto, los tripomastigotes se transforman en epimastigotes (Figura 11.B). Algunos de los parásitos son lisados a nivel estomacal, mientras que otros pasan al intestino del insecto donde se dividen por fisión binaria (Figura 11.C). Los epimastigotes se adhieren a la membrana de las células intestinales de la chinche, lo que desencadena la transformación en tripomastigotes metacíclicos (metacicloogénesis), que son expulsados con las heces del vector (Figura 11.D) (Teixeira et al. 2012, de Souza, de Carvalho, and Barrias 2010, Boscardin et al. 2010).

Cuando se produce el rascado de la picadura, los parásitos entran en contacto con la herida, comenzando la fase del ciclo en el hospedador mamífero (Figura 11.E). El parásito alcanza el torrente sanguíneo e invade diferentes tipos de células como macrófagos, células musculares, células epiteliales y neuronas. Al igual que en el ciclo biológico de *Leishmania spp.*, el parásito se adhiere a la membrana de la célula del hospedador, y en el caso de la invasión de macrófagos, es fagocitado mediante la emisión de pseudópodos (Figura 11.F). Una vez internalizado en la vacuola parasitófora, los lisosomas no afectan al parásito, que se transforma en amastigote. Esta transformación viene acompañada de la rotura de la membrana vacuolar. Una vez en el citoplasma de la célula hospedadora, los amastigotes se dividen con un tiempo de duplicación de 12 horas durante 4 o 5 días, llegando a ocupar por completo el citoplasma (Figura 11.G) (Bern 2015). Posteriormente, los amastigotes se transforman de nuevo en tripomastigotes (Figura 11.H), caracterizados por su motilidad. Estos tripomastigotes son liberados por la ruptura de la membrana celular (Figura 11.I), pudiendo infectar nuevas células, o ser ingeridos por el vector (Teixeira et al. 2012).



**Figura 11. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.**

#### 1.4.3. EPIDEMIOLOGÍA Y PATOLOGÍA

La transmisión de la enfermedad de Chagas ocurre generalmente mediante la picadura del insecto triatomino, aunque existen otras vías de transmisión menos frecuentes como la ingesta de alimentos contaminados, transmisión congénita, o por transfusión de sangre de pacientes

infectados (Guarner 2019). Se han reportado casos de transmisión sexual mediante experimentos *in vivo* en ratones, sin embargo, no existen casos conocidos de transmisión sexual en humanos (Echeverria and Morillo 2019).

La enfermedad de Chagas causa más de 7000 muertes al año en América latina, donde constituye uno de los principales problemas de salud pública. Se estima que existen 7 millones de personas infectadas en el mundo y 75 millones de personas en riesgo de infección por el parásito *Trypanosoma cruzi*, principalmente en países latinoamericanos, aunque en expansión a otras áreas por los movimientos migratorios de la población infectada (Figura 12) (WHO 2017).



**Figura 12. Distribución de casos de la enfermedad de Chagas reportados a la OMS (datos de 2010) (UNITING-TO-COMBAT-NTDS 2017).**

El periodo de incubación tras la transmisión por el insecto es de una a dos semanas, tras las que comienza la fase aguda de la enfermedad. La sintomatología en esta fase es inespecífica: fiebre, malestar, hepatoesplenomegalia y linfocitosis. En algunos casos aparece el llamado chagoma (nódulo en la piel) o un edema palpebral llamado signo de Romaña, indicativos del lugar de inoculación (Figura 13). La mayor parte de las infecciones agudas no son detectadas (Bern 2015, WHO 2010, Guarner 2019).



**Figura 13. Paciente presentando el signo de Romaña característico de la fase aguda de la infección por *Trypanosoma cruzi*. (Fuente: CDC)**

Aunque es fatal en un 2 – 8% de los casos, generalmente la fase aguda es leve, los síntomas desaparecen espontáneamente, y la parasitemia es indetectable en el curso de 4 a 8 semanas. Comienza entonces la fase crónica de la enfermedad de Chagas (Bern 2015, Chatelain 2017).

La mayor parte de la población infectada no presentará nunca síntomas de la enfermedad (estado crónico indeterminado). Sin embargo, se estima que un 20 – 30% de los pacientes presentará cardiomiopatía asociada a la enfermedad de Chagas generalmente entre 10 y 30 años después de la fase aguda. Los primeros signos de esta patología son problemas en la conducción cardíaca, arritmias y aneurismas. El fallo cardíaco y la muerte súbita son las causas más frecuentes de muerte en enfermos de Chagas (Bern 2015, Chatelain 2015, Echeverría and Morillo 2019).

Por otro lado, cerca de un 10% de las personas infectadas desarrollará en la fase crónica la manifestación gastrointestinal de la enfermedad de Chagas, caracterizada por afectar al esófago y al colon (WHO 2010). Esta manifestación es más prevalente en países del sur que en Centro América (Bern 2015).

En el caso de la transmisión congénita del parásito, los neonatos suelen ser asintomáticos, sin embargo, en ciertos casos, pueden ser prematuros, presentar bajo peso al nacer, hepatoesplenomegalia, anemia y trombocitopenia. Rara vez presentan cuadros graves de miocarditis o meningoencefalitis. Se estima que el 5% de los niños nacidos de madres portadoras del parásito contraen la enfermedad de forma congénita (Pérez-Molina et al. 2015, Guarner 2019).

La evidencia sugiere que la respuesta inmune inflamatoria del hospedador es el determinante fundamental de progresión de la enfermedad junto con la virulencia de la cepa parasitaria y el tropismo tisular (Bern 2015).

La especie *T. cruzi* es muy diversa en genotipos y fenotipos, por lo que en 2009 se agruparon las cepas de este parásito en seis DTUs (*Discrete Typing Units*), de TcI a TcVI. Posteriormente se incluyó una séptima DTU asociada a murciélagos, TcBat (Zingales et al. 2012). Las DTUs se definen como “conjuntos de poblaciones que están genéticamente más relacionadas entre sí que con cualquier otra población y que son identificables por marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos comunes” (Zingales et al. 2009). El espectro peptídico obtenido mediante espectrometría de masas en tándem permite diferenciar las DTUs (Guarner 2019).

La presencia de múltiples cepas en la misma área geográfica y la posibilidad de la coinfección por DTUs con diferente virulencia o tropismo tisular, complican aún más el manejo de esta patología (Chatelain 2015).

#### La cardiomiopatía chagásica

La patogenia de esta cardiomiopatía no se comprende totalmente en la actualidad. Existen diversos mecanismos que podrían estar implicados: la persistencia parasitaria, daños en el miocardio mediados por el sistema inmune, así como alteraciones neurogénicas y microvasculares.

La participación del parásito en el desarrollo de la cardiomiopatía ha sido sujeto de controversia en las últimas décadas. Varios estudios situaban la respuesta autoinmune como principal responsable del desarrollo de esta patología y consideraban que el tratamiento antiparasitario en la fase crónica de la enfermedad era irrelevante. Esta hipótesis ha frenado durante décadas el tratamiento antiparasitario de pacientes en fase crónica, así como la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos eficaces en esta fase de la enfermedad (Kratz et al. 2018).

Recientemente varios estudios han demostrado que es la persistencia del parásito acoplada a un fallo en el sistema inmune del hospedador, en ocasiones de carácter autoinmune, lo que provoca las lesiones de carácter inflamatorio propias de este tipo de cardiopatía. Por lo tanto, la persistencia parasitaria es crucial para el desarrollo y la progresión de la cardiomiopatía chagásica, y por ello, la eliminación del parásito es fundamental para detener la progresión de la enfermedad incluso en su fase crónica.

Varios modelos animales apoyan esta hipótesis al demostrar que existe una correlación directa entre la carga parasitaria y la intensidad de la inflamación. Además, el tratamiento tripanocida con benznidazol no elimina por completo el parásito, pero la disminución en la carga parasitaria se traduce en una atenuación de la miocarditis en modelos animales. Otros estudios han observado el agravamiento de la enfermedad y aumento en la carga parasitaria en animales y humanos expuestos a reinfección. Además, se ha encontrado material genético de *T. cruzi* en muestras cardiacas de enfermos de Chagas con cardiomiopatía, al contrario que en pacientes seropositivos asintomáticos (Rassi Jr, Marin Neto, and Rassi 2017).

Por otro lado, el daño tisular mediado por el sistema inmune está causado por la infiltración de células mononucleares y consiguiente liberación de citoquinas, que juegan un papel importante en el desarrollo de esta cardiomiopatía. Estos mecanismos del sistema inmune probablemente sean debidos a la presencia del parásito, si bien no se descarta la respuesta autoinmune como causante (Rassi Jr, Marin Neto, and Rassi 2017).

En la actualidad se considera a esta patología como una enfermedad crónica inflamatoria mantenida por la persistencia parasitaria en los órganos afectados. En base a este nuevo paradigma, en las últimas décadas se ha evaluado la eficacia y seguridad de los fármacos antiparasitarios disponibles y aquellos en desarrollo para el tratamiento de la enfermedad de Chagas en fase crónica (Rassi Jr, Marin Neto, and Rassi 2017, Urbina 2015).

#### 1.4.4. DIAGNÓSTICO

La enfermedad de Chagas está infradiagnosticada debido a los largos periodos asintomáticos que la caracterizan. Como consecuencia, se estima que sólo el 1% de la población infectada recibe tratamiento. Además, el diagnóstico frecuentemente se obtiene cuando la enfermedad se encuentra en fase crónica, en la que los tratamientos disponibles son poco eficaces.

Durante la fase aguda de la enfermedad, la alta parasitemia permite el diagnóstico por detección microscópica de tripomastigotes en sangre (Guarner 2019). La detección por PCR es el diagnóstico de elección en fase aguda por su alta sensibilidad, especialmente en casos de sospecha de infección congénita o por trasplante de un individuo infectado. Sin embargo, es un método que presenta resultados poco reproducibles para la detección de la infección en fase crónica, en la que la parasitemia es baja a pesar de la persistencia parasitaria en tejidos.

En el caso de la infección en fase crónica, el diagnóstico se realiza mediante la serología para la detección de IgG, utilizando la técnica ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) o IFA

(*Immunofluorescent antibody assay*). Sin embargo, no existe un método diagnóstico lo suficientemente sensible y específico como para ser utilizado en exclusiva en la fase crónica. Se requiere de un resultado positivo en dos pruebas para la confirmación del diagnóstico, preferiblemente basadas en antígenos diferentes (Bern 2015, Alonso-Padilla et al. 2017, Guarner 2019).

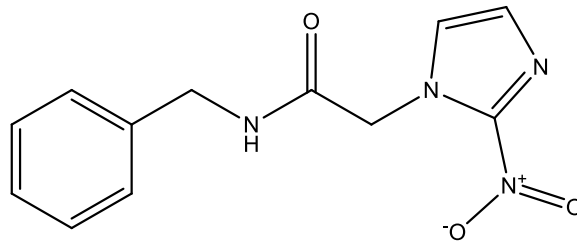
La falta de test diagnósticos que permitan evaluar la eficacia del tratamiento ha dificultado enormemente los ensayos clínicos para el desarrollo de fármacos frente a esta enfermedad. Los test serológicos empleados en el diagnóstico no son útiles a la hora de evaluar la eficacia de un fármaco debido a que la seroconversión del paciente adulto puede tardar años o décadas en producirse. Como consecuencia, y a falta de marcadores subrogados de la disminución de la carga parasitaria, el método empleado en ensayos clínicos es la PCR. Dada la baja parasitemia en fase crónica, la detección por PCR supone un reto, que ha sido solventado mediante el uso de qPCR (Chatelain 2017, Ramírez et al. 2015).

Sin embargo, esta técnica no deja de tener claras limitaciones. Dada la fluctuación de parasitemia propia del curso de la enfermedad y la sensibilidad de esta prueba, la PCR puede utilizarse como medida de fracaso del tratamiento, pero nunca como medida de la eficacia. Del mismo modo, hace necesario emplear como criterio de inclusión en los ensayos clínicos el resultado de PCR positiva. Con todo ello, la PCR permite evaluar el fracaso de un tratamiento en ensayos de prueba de concepto, sin embargo, a la hora de evaluar el posible fármaco en fase III se plantea la necesidad de demostrar su eficacia (Chatelain 2017).

#### 1.4.5. TRATAMIENTO

##### Benznidazol

El benznidazol (Figura 14), un 2-nitroimidazol, es el fármaco de primera elección para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, que comenzó a comercializarse en la década de los 70. Aunque no fue aprobado por la FDA hasta el año 2017 (Thakare, Dasgupta, and Chopra 2018, Alpern, Lopez-Velez, and Stauffer 2017, Kratz et al. 2018).



**Figura 14. Estructura del benznidazol.**

La pauta posológica es de 5 – 7 mg/kg/día en adultos y 10 mg/kg/día en niños durante 60 días por vía oral. Su baja solubilidad y la larga duración del tratamiento favorecen la aparición de efectos adversos como hipersensibilidad, depresión de la médula ósea y neuropatía periférica. En general, se trata de un fármaco mejor tolerado por los niños que por los adultos y su uso está contraindicado durante el embarazo. La tasa de abandono del tratamiento con benznidazol es de entre 13% y 32% según diversos estudios clínicos en función de la dosis empleada (Morillo et al. 2017, Bermúdez et al. 2016).

La cura parasitológica (PCR sanguínea negativa) se alcanza en el 90% de los casos de infección congénita y en un 76 – 85% de los pacientes en fase aguda. La cura serológica se alcanza en el 100% de los neonatos infectados si reciben tratamiento en el primer año de vida y en el 76% de los enfermos en fase aguda. La eficacia del tratamiento con benznidazol en la fase aguda de la enfermedad varía según el área geográfica, debido probablemente a la diferente sensibilidad al fármaco de las distintas DTUs del parásito (Urbina 2015, Pérez-Molina et al. 2015).

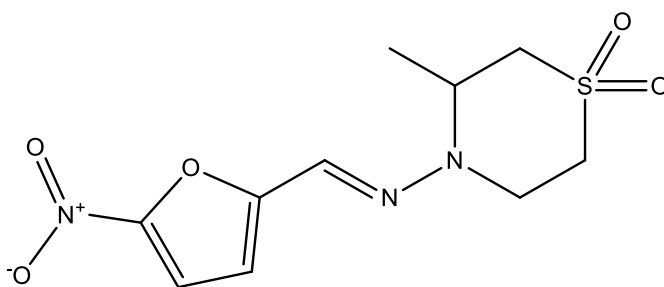
En líneas generales se considera que el benznidazol no es eficaz en el tratamiento de la enfermedad crónica de Chagas. El estudio “BENEFIT” (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) concluye que el tratamiento tripanocida en la fase crónica de la enfermedad de Chagas con benznidazol no reduce significativamente el deterioro cardiaco en pacientes con cardiomiopatía chagásica establecida a pesar de reducir la persistencia parasitaria en sangre. Sin embargo, existe controversia al respecto debido al diseño del estudio, principalmente por los criterios de inclusión de los pacientes y utilización de qPCR en muestras de sangre como medida de persistencia parasitaria, por lo que se plantea la necesidad de estudiar más detalladamente el efecto del fármaco en esta fase de la enfermedad (Bern 2017, Rassi Jr, Marin Neto, and Rassi 2017, Morillo et al. 2015, Kratz et al. 2018).

El benznidazol es un profármaco que requiere la activación por nitrorreductasas de tipo I parasitarias para ser activo, tras dicho proceso, los metabolitos reactivos afectan principalmente a rutas metabólicas a través del glutatión y la tripanotona mediante la unión covalente a grupos

tiol. La generación de especies reactivas es también responsable de sus efectos secundarios. Se ha observado que una disminución en la expresión de la nitrorreductasa tipo I confiere resistencia a compuestos nitroheterocíclicos como el benznidazol o el nifurtimox al disminuir su activación. En la naturaleza existen cepas de *T. cruzi* resistentes a estos fármacos (Wilkinson et al. 2008, Keenan and Chaplin 2015).

### Nifurtimox

El nifurtimox (Figura 15), un 5-nitrofurano comercializado en la década de los 70, se utiliza como tratamiento de segunda elección para la enfermedad de Chagas.



**Figura 15. Estructura del nifurtimox.**

La pauta posológica recomendada por la OMS es 8 – 10 mg/kg/día en tres tomas para adultos y 15 – 20 mg/kg/día en cuatro tomas para niños, durante 60 – 90 días. Los efectos adversos más comunes son gastrointestinales y dermatológicos y afectan a más de la mitad de los pacientes, y hasta un 30% puede sufrir reacciones adversas de tipo neurológico (convulsiones, polineuritis, confusión y psicosis). En general, los efectos secundarios de este fármaco son de mayor gravedad que aquellos del benznidazol. Del mismo modo, la toxicidad cardiaca del nifurtimox es mayor, lo que implica un mayor riesgo de fallo cardiaco en los pacientes de Chagas (Rodríguez, Falcone, and Szajnman 2016, Bermúdez et al. 2016, Pérez-Molina et al. 2015).

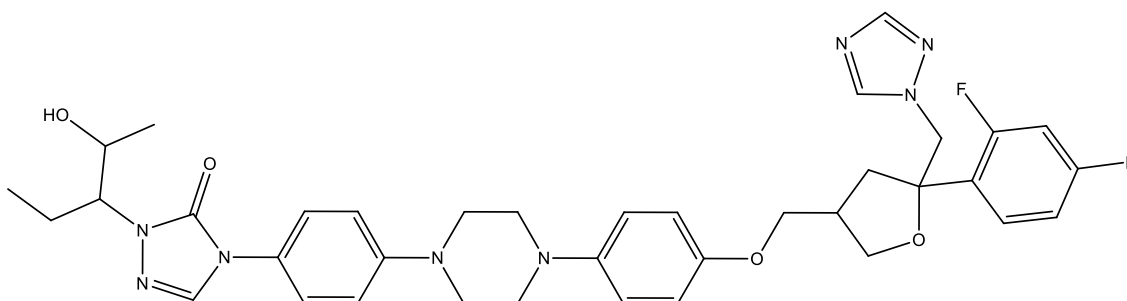
Al igual que el benznidazol, el nifurtimox es un profármaco que se activa por las nitrorreductasas parasitarias dando lugar a una molécula citotóxica. El mecanismo de acción específico de esta molécula activa no se conoce en la actualidad (Hall, Bot, and Wilkinson 2011).

### Posaconazol

El posaconazol (Figura 16) y otros azoles fueron los primeros compuestos en alcanzar las fases clínicas del desarrollo de fármacos tras el descubrimiento de benznidazol y nifurtimox para el tratamiento de esta enfermedad. La existencia de resistencias frente a los citados fármacos llevó a la búsqueda de mecanismos de acción alternativos frente a *T. cruzi*, como los inhibidores de la

biosíntesis del ergosterol. El posaconazol, entre otros azoles, actúa inhibiendo CYP51 (esterol C14-demetilasa) y por tanto interfiere en la síntesis del ergosterol, esencial para la membrana del microorganismo (Bermúdez et al. 2016, Custodio Leite 2019).

Sin embargo, en estudios de fase II en pacientes sin función cardiaca comprometida (CHAGASAZOL y STOP-CHAGAS) se observó que el 80 – 90% de los pacientes tratados con posaconazol presentaban parasitemia detectable un año tras el tratamiento (evaluado mediante qPCR de sangre periférica). En contraste, la tasa de fallo del benznidazol fue del 6% en aquellos individuos en los que se completó el protocolo de ensayo (análisis *per protocol*), o del 38% considerando aquellos incluidos en el estudio (análisis de *intention-to-treat*) (Bern 2017, Morillo et al. 2017, Molina et al. 2014, Urbina 2015).

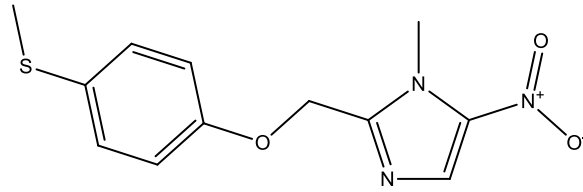


**Figura 16. Estructura del posaconazol.**

Existe controversia a cerca de la causa del fracaso del posaconazol en ensayos clínicos. Para algunos investigadores, este fallo se explica por la actividad tripanostática del fármaco, mientras que otros apuntan a un problema de niveles de exposición insuficientes (Urbina 2015, Urbina 2017, Francisco et al. 2015, Moraes et al. 2014).

### Fexinidazol

El fexinidazol (Figura 17) es un 5-nitroimidazol en estudio como candidato para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Inicialmente estudiado como posible tratamiento de la enfermedad del sueño, comenzó la fase I de ensayos clínicos en el año 2010 y ha recibido recientemente la opinión positiva de la EMA para el tratamiento de la enfermedad producida por *T. b. gambiense* (Bahia et al. 2012, Deeks 2019).



**Figura 17. Estructura del fexinidazol.**

Tanto el fexinidazol como su metabolito fexinidazol sulfona han obtenido resultados prometedores en modelos animales de fase aguda de enfermedad de Chagas (Bahia et al. 2014). En el año 2014 se realizó un estudio de fase II (prueba de concepto) en Bolivia, aunque fue suspendido por problemas de toxicidad. Tras un ajuste de las dosis del fármaco a estudiar y de la duración del tratamiento, en 2017 comenzó un nuevo estudio en España cuyos resultados aún no están disponibles (DNDi 2018, Deeks 2019, Custodio Leite 2019).

#### 1.4.6. NECESIDAD DE NUEVOS TRATAMIENTOS

Actualmente encontramos multitud de retos en la lucha contra esta enfermedad: la mejora del diagnóstico, el entendimiento de la progresión de la enfermedad, la búsqueda de marcadores que permitan monitorizar la carga parasitaria de los pacientes y por tanto evaluar la eficacia de los fármacos, y por supuesto, el desarrollo de tratamientos eficaces. Aunque la patogenia de la cardiomiopatía chagásica no se conoce en profundidad, se considera que la persistencia del parásito es clave en la enfermedad, lo que conlleva la necesidad de nuevos tratamientos efectivos en fase crónica (Bern 2015, Pérez-Molina et al. 2015, Dumonteil and Herrera 2017).

En el desarrollo de nuevos fármacos se plantea también la posibilidad de buscar efectos sinérgicos con los fármacos ya disponibles, de manera que pueda disminuirse su dosis y con ello, sus efectos adversos (Bermúdez et al. 2016, Alcântara et al. 2018). Teniendo en cuenta la posibilidad de emplear fármacos en combinación y el problema que supone el desarrollo de resistencias, actualmente se buscan moléculas con diferente mecanismo de acción, ya que todos los tratamientos disponibles hoy en día son profármacos bioactivados por la misma enzima (Chatelain 2017).

Desde el fracaso de los ensayos clínicos de posaconazol se ha buscado desarrollar ensayos *in vitro* e *in vivo* que permitan discernir el comportamiento de posaconazol y benzimidazol o nifurtimox, de manera que pueda predecirse de mejor manera el comportamiento de los futuros fármacos en las fases clínicas de desarrollo (Chatelain 2017).

## 1.5. DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS

### 1.5.1. EL PROCESO DE DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS: DEL LABORATORIO A LOS PACIENTES

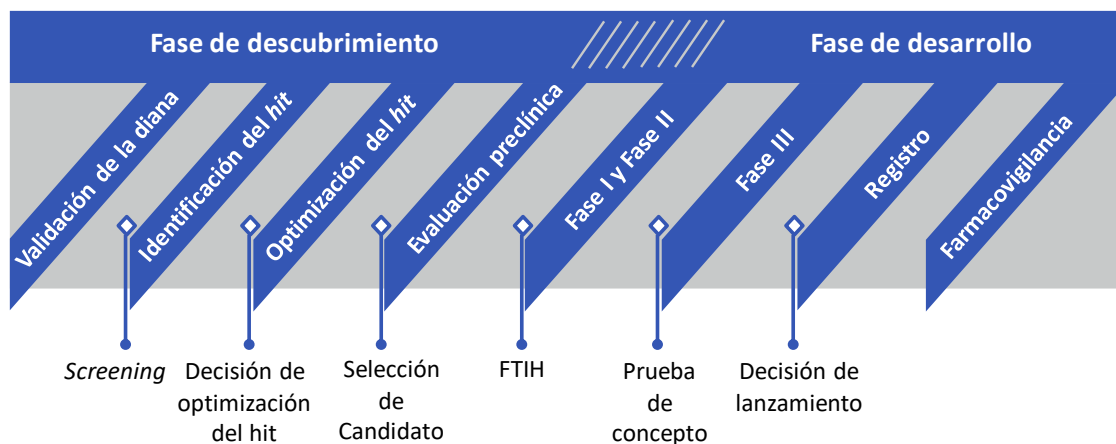
Se estima que el proceso de descubrimiento y desarrollo de un fármaco supone una inversión por parte de la industria de 2600 millones de dólares (DiMasi, Grabowski, and Hansen 2016). Normalmente, desde las etapas iniciales de búsqueda de fármacos hasta la aprobación por parte de las agencias reguladoras transcurren más de 13 años (Paul et al. 2010).

El proceso de descubrimiento de fármacos (Figura 18) generalmente comienza con la identificación y validación de una diana terapéutica, ya sea molecular o celular (Hughes et al. 2011). Una vez identificada la diana cuya actividad se quiere modular se procede a la búsqueda de moléculas, generalmente de bajo peso molecular, que produzcan la acción deseada (por ejemplo, inhibición de la diana). Las moléculas seleccionadas en esta fase del proceso se denominan *hits*.

Para la selección de *hits* se recurre al *screening* o cribado, que consiste en la evaluación de la actividad de compuestos frente a la diana de interés. Este tipo de actividad requiere el desarrollo previo de ensayos bioquímicos o celulares de gran sensibilidad y calidad. Tras la identificación de *hits*, se procede a la optimización de los mismos en programas de química médica con el objetivo de mejorar su potencia, selectividad y sus propiedades fisicoquímicas, relacionadas con las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Tras estas mejoras, el compuesto de interés es declarado “candidato”, y comienzan los ensayos preclínicos en modelos animales para determinar la seguridad del fármaco y elegir la dosis para los futuros ensayos clínicos.

Una vez superados con éxito los estudios preclínicos, el fármaco se evalúa en ensayos clínicos de fase I para determinar su seguridad en un pequeño grupo de personas voluntarias sanas comenzando por el hito FTIH (por sus siglas en inglés, *First Time In Human*, primera administración a humanos). En caso de obtener resultados adecuados, se progresa el fármaco a la fase II, donde se evalúa su eficacia en un grupo reducido de pacientes. Posteriormente, durante la fase III de ensayos clínicos, la eficacia del fármaco es testada en un grupo mucho mayor de pacientes (de varios cientos a miles de personas). Durante los ensayos clínicos, se compara la eficacia y seguridad del futuro fármaco con otras alternativas terapéuticas ya disponibles si existen. Tras esta fase, si los resultados son positivos, el fármaco será aprobado por las agencias reguladoras para la indicación estudiada en los ensayos. Una vez comercializado el fármaco tiene lugar la fase IV de investigación clínica o farmacovigilancia, que durará toda la

vida del mismo, y en la que se registrarán y notificarán todas las reacciones adversas asociadas a su uso.



**Figura 18. Esquema del proceso de descubrimiento y desarrollo de un fármaco.**

### 1.5.2. LAS ETAPAS INICIALES DEL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS: LA IDENTIFICACIÓN DE *HITS*

El objetivo de cualquier *screening* es encontrar compuestos que puedan ser empleados como punto de partida para el desarrollo de un fármaco, con propiedades biológicas, fisicoquímicas y toxicológicas adecuadas (Dahlin 2014).

Existen diferentes modelos de *screening* para la identificación de *hits* (Tabla 2). Uno de los más empleados es el cribado de alto rendimiento, del inglés *High Throughput Screening* o HTS, que consiste en la evaluación de la actividad de grandes librerías de compuestos frente a la diana de interés (Hughes et al. 2011).

Los fármacos que fallan en las fases clínicas de investigación lo hacen principalmente por dos motivos: falta de eficacia o falta de seguridad. Generalmente los fallos en fases preclínicas están relacionados con toxicidad, mientras que la falta de eficacia es la principal responsable de los fracasos en las fases clínicas (más comunes en fase II) (Bayliss et al. 2016, Morgan et al. 2012). Para reducir al mínimo esta posibilidad de fallo, constante reto de la industria farmacéutica, es necesario prestar especial atención a la calidad a lo largo de todo el proceso. En el proceso de HTS, objeto de esta Tesis, los resultados dependen tanto de la calidad del ensayo y su diseño, como de la calidad de la librería evaluada. Del mismo modo, el éxito de un *screening* depende del correcto diseño de la cascada de progresión de los compuestos, tanto a nivel de las propiedades biológicas como fisicoquímicas de los mismos (Dahlin 2014). Por otro lado, es fundamental la disminución del fracaso de las moléculas debida a problemas de toxicidad, por

lo que se recomienda evaluar la posible toxicidad de los compuestos en las fases más tempranas del proceso y guiar el desarrollo de los fármacos no solo en base a su potencia frente a la diana si no también en función de su selectividad (Nicolaou 2014).

**Tabla 2. Descripción de las diferentes tipologías de *screening* para el descubrimiento de fármacos.**

Tipo de <i>screening</i>	Descripción
HTS	Análisis de grandes colecciones de compuestos.
Dirigido ( <i>Focused screen</i> )	Estudio de grupos de compuestos con características comunes conocidas (por ejemplo: estructuras concretas, inhibidores de kinasas).
Virtual	Conociendo la estructura de la diana o de alguno de sus ligandos, puede estudiarse <i>in silico</i> la capacidad de los compuestos de unirse a dicha diana.

#### Colección de compuestos

En el éxito de un programa de descubrimiento de fármacos influye enormemente la calidad de los productos de partida: los compuestos. Las grandes librerías de moléculas que se evalúan en un proceso de HTS generalmente representan una amplia diversidad química. Los compuestos que las componen son de bajo peso molecular y obedecen reglas en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas que los hacen más adecuados como posibles fármacos.

En el proceso de *screening* habrá que tener en cuenta las propiedades fisicoquímicas de los *hits* para priorizar las diferentes moléculas o en el proceso de síntesis de análogos y estudios de SAR (*Structure Activity Relationship*), aunque finalmente la decisión de continuar el desarrollo de una molécula estará guiada por multitud de factores: biológicos, químicos, comerciales,... (Bayliss et al. 2016).

Las propiedades fisicoquímicas que más influyen en el éxito de una molécula de administración oral son la solubilidad, la dosis y la lipofilia. Hay que tener en cuenta que no son propiedades independientes, así, la dosis depende de la potencia del compuesto y su solubilidad; y a su vez la potencia se ve influenciada por la lipofilia, que está muy relacionada con la solubilidad. Por otro lado, el número de anillos aromáticos, independientemente de la lipofilia, afecta negativamente a una serie de parámetros de desarrollo como son la solubilidad, la inhibición de citocromo P450 y la inhibición de hERG (Bayliss et al. 2016). Está generalmente aceptado que el

número máximo de anillos aromáticos en un candidato a fármaco es tres, sin embargo existen excepciones (Nicolaou 2014).

Parte de la calidad de una colección de compuestos depende de la promiscuidad de los mismos, generalmente a mayor lipofilia, mayor potencia, pero también mayor promiscuidad y peor solubilidad en medio acuoso. Baell y Holloway describen en el año 2010 una serie de subestructuras a las que denominan PAINS (*Pan-assay interference compounds*) que muestran actividad biológica en numerosos ensayos (Baell and Holloway 2010). Las moléculas que contengan estas subestructuras no serán adecuadas como candidatos por su promiscuidad. Se calcula que incluso las librerías más cuidadas contienen aproximadamente un 5% de PAINS (Dahlin 2014).

### Elección y desarrollo del ensayo

No hay que olvidar que el fracaso de una molécula candidata no se puede atribuir en todos los casos a su estructura, si no que en muchas ocasiones estos fallos se deben a la falta de entendimiento del proceso patológico asociado a la enfermedad. En este contexto es de vital importancia elegir y desarrollar un método de ensayo que sea robusto y biológicamente relevante en el contexto de la enfermedad (Macarrón and Hertzberg 2009). El ensayo debe estar configurado de manera que permita discernir los compuestos activos en el sistema biológico, tener baja variabilidad y alta relación señal/ruido, de manera que se minimicen los falsos positivos y falsos negativos, y ser tiempo y coste-efectivo.

A la hora de seleccionar un método de ensayo para el *screening* de compuestos hay que tener en cuenta los siguientes factores (Hughes et al. 2011):

- Relevancia biológica: adecuado a la patología propia de la enfermedad.
- Reproducibilidad: entre placas, días...
- Coste: puede disminuirse con la miniaturización de ensayos.
- Calidad: generalmente determinada mediante el parámetro Z' (Zhang 1999).
- Tolerancia al DMSO: ampliamente utilizado como disolvente de compuestos.

En cuanto a la clase de ensayo podemos distinguir dos tipos de *screening*: *target-based* (basado en la diana) y fenotípico. En el contexto de esta Tesis, trabajando con *screening* antiparasitarios, es comúnmente aceptado que la tipología de ensayo fenotípico es más relevante en el contexto biológico de la enfermedad. No hay que olvidar que, en el caso de enfermedades de etiología infecciosa, el organismo causante es la diana en sí mismo. En el caso de compuestos

seleccionados mediante ensayos basados en una diana molecular concreta, deberá evaluarse su eficacia antibiótica posteriormente en un ensayo fenotípico (Martín, Cantizani, and Peña 2018). En el caso de las moléculas identificadas mediante el uso de ensayos fenotípicos, posteriormente se podrá identificar la diana molecular. El uso de ensayos fenotípicos como *screening* primario de una colección de compuestos permite por tanto identificar *hits*, que posteriormente podrán dar lugar a la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

En términos de tiempo y coste-efectividad, los ensayos fenotípicos generalmente son preferibles a los bioquímicos. Los desarrollos de ensayo suelen ser genéricos y más sencillos, siempre y cuando el cultivo *in vitro* del parásito sea posible. Las principales ventajas e inconvenientes de los distintos tipos de ensayos se recogen en la Tabla 3.

**Tabla 3. Comparación de los distintos modelos de screening (Martín, Cantizani, and Peña 2018).**

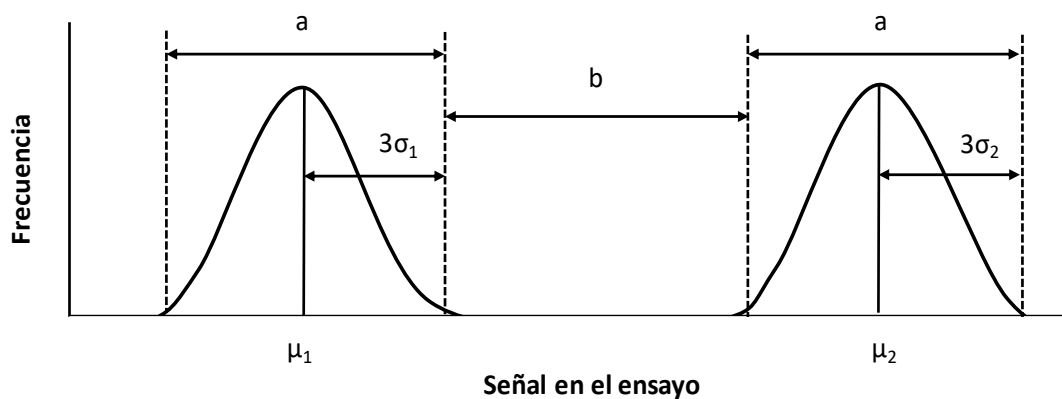
Característica		<i>Target-based</i>	Fenotípico
Ensayo	Respuesta	Medida directa o indirecta de la actividad de una diana determinada.	Supervivencia o muerte celular.
	Barreras que debe atravesar el compuesto	Ninguna	Membrana plasmática de la célula hospedadora y del orgánulo que contenga al parásito. Membrana del parásito. Bombas de exclusión y transportadores presentes.
Hits	Sensibilidad/Potencia	Media-Alta	Baja-Media
	Especificidad	Alta	Baja
	Novedad	Alta	Baja
	Espacio químico	Pequeño	Amplio
	Eficacia	Baja	Alta
	SAR orientado a la diana	Sí	No
Factible	Suministro de reactivos	Laborioso	Sencillo
	Desarrollo del ensayo	Laborioso	Sencillo
	Coste	Alto	Bajo

### Análisis de los datos de *screening*

Para el análisis de los resultados de *screening* se recurre a herramientas estadísticas para la toma de decisiones. Desde su publicación en 1999 (Zhang 1999), el parámetro adimensional  $Z'$  ha sido utilizado en el campo del HTS como principal parámetro estadístico indicativo de la calidad del ensayo, ya que tiene en cuenta no sólo la media (AV) de los valores de los controles, si no la desviación estándar (SD) de los mismos. El valor  $Z'$  es, por tanto, un indicativo de la separación de las dos poblaciones de control (Figura 19), resultante de la siguiente ecuación, siendo ctrl1 el control representante del 0% de inhibición y ctrl2 el equivalente al control 100% de inhibición:

$$Z' = 1 - 3 \times \frac{(SD_{ctrl2} + SD_{ctrl1})}{|AV_{ctrl2} - AV_{ctrl1}|}$$

Un valor adecuado de  $Z'$  es necesario para diferenciar compuestos activos e inactivos, sin embargo, este parámetro proporciona información únicamente del comportamiento de las dos poblaciones control. Será fundamental determinar la posible presencia de patrones en la población de muestras y corregirlos en la medida de lo posible (Coma, Herranz, and Martín 2009).



**Figura 19. Distribución de dos poblaciones control (a) y separación entre ambas poblaciones (b). Parámetros estadísticos para el cálculo de  $Z'$ : media ( $\mu$ ) y desviación estándar ( $\sigma$ ) (Zhang 1999).**

A la hora de analizar los datos del ensayo primario para seleccionar los *hits* debe tenerse en cuenta tanto la estadística como la logística. Generalmente se utiliza un *cut-off* estadístico que permita seleccionar un número de compuestos asumible en los siguientes ensayos de la cascada de progresión.

### 1.5.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE *HITS* PARA LA LEISHMANIASIS VISCERAL Y LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

En términos generales, un fármaco antiinfeccioso debe ser seguro, eficaz, asequible y estar disponible para los pacientes que lo necesiten (Alcântara et al. 2018). Estos requisitos se trasladan a las fases iniciales de búsqueda de fármacos en forma de criterios de selección de *hits* (Tabla 4).

**Tabla 4. Principales criterios de selección de *hits* para leishmaniasis visceral y enfermedad de Chagas (Don and Ioset 2014).**

criterio	Parámetro	Hit VL	Hit Chagas
Eficacia <i>in vitro</i>	Actividad	IC <sub>50</sub> ≤ 10 μM frente a <i>L. donovani</i> o <i>L. infantum</i> ensayo intracelular	IC <sub>50</sub> ≤ 10 μM frente a amastigotes <i>T. cruzi</i> en ensayos intracelulares DTUs TcVI (Tulahuen) o TcII/Y
	Selectividad	Al menos 10x frente a línea celular de mamífero	Al menos 10x frente a línea celular de mamífero
ADME <i>in silico</i>	Regla de Lipinski	Se utilizará como criterio para priorizar, pero no como criterio de selección	
Toxicidad <i>in silico</i>	Alertas estructurales	Proceder con cautela y ensayar en fases iniciales para determinar el alcance del problema	
Perfil químico	Química abordable	Ruta sintética del compuesto o análogos con menos de 8 pasos	
	Estereoquímica	Determinada como parte del perfil químico del compuesto	

## 2. OBJETIVOS



## 2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es el descubrimiento de uno o varios compuestos novedosos para el tratamiento de las enfermedades producidas por *Leishmania donovani* y *Trypanosoma cruzi*, mediante el cribado de la colección de 150 000 compuestos proporcionada por Calibr.

La hipótesis de partida es que el *screening* de nuevas colecciones de compuestos químicos mediante el diseño y la ejecución de las cascadas de progresión que se describen en la presente Tesis Doctoral permite seleccionar compuestos cidas, eficaces, específicos y selectivos frente a *L. donovani* y *T. cruzi*.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### 2.2.1. LEISHMANIA DONOVANI

Para la consecución del objetivo general respecto a este parásito se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Realización del *screening* de la colección de 150 000 compuestos en el ensayo axénico de *L. donovani*.
- Caracterización de la actividad de los compuestos activos en el ensayo *InMac* frente a *L. donovani*.
- Determinación de la toxicidad de los compuestos en las líneas celulares THP-1 y HepG2.
- Evaluación biológica de los análogos disponibles de los compuestos seleccionados.
- Caracterización del perfil biológico de los *hits* respecto a su actividad frente a *L. donovani* y *T. cruzi*, así como su toxicidad en las líneas celulares disponibles.

### 2.2.2. TRYPANOSOMA CRUZI

Para la consecución del objetivo general respecto a este parásito se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Realización del *screening* de la colección de 150 000 compuestos en el ensayo  $\beta$ -galactosidasa frente a *T. cruzi*.
- Caracterización de la actividad de los compuestos activos en el ensayo *Imaging* frente a *T. cruzi* y en el ensayo de tripomastigotes.
- Determinación de la toxicidad de los compuestos en las líneas celulares H9c2 y HepG2.

- Evaluación biológica de los análogos disponibles de los compuestos seleccionados.
- Caracterización del perfil biológico de los *hits* respecto a su actividad frente a *L. donovani* y *T. cruzi*, así como su toxicidad en las líneas celulares disponibles.
- Determinación de la cidalidad de los *hits* frente a *T. cruzi* mediante el ensayo *Rate of Kill* (RoK).
- Estudiar la capacidad de al menos un compuesto de potenciar el efecto cida del benznidazol en combinación en el ensayo RoK.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1. CULTIVO DE LAS CÉLULAS DE MAMÍFERO Y PARÁSITOS

El parásito *Leishmania donovani* de la cepa LdBOB que expresa GFP (*Green Fluorescent Protein*) fue proporcionado por el Dr. Manu de Rycker (Dundee University). Para el mantenimiento del cultivo de amastigotes axénicos se realizan pases del cultivo tres veces en semana a una densidad de 5000 células/mL en medio “AM” a pH 5.6 cuya composición se recoge a continuación en la Tabla 5.

**Tabla 5. Composición del medio AM para el cultivo axénico de amastigotes de *Leishmania donovani*.**

Este medio se filtra a 0.22 µm para asegurar su esterilidad.

Reactivo	Concentración	Casa Comercial
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136 mM	Merck
MgSO <sub>4</sub>	0.5 mM	Merck
KCl	15 mM	Invitrogen
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	24 mM	Invitrogen
Glucosa	25 mM	Sigma
L-Glutamina	1 mM	Invitrogen
100 x RPMI <i>Vitamin solution</i>	1x	Sigma
Ácido Fólico	10 µM	Sigma
Adenosina	100 µM	Sigma
Hemina	5 mg/L	Fluka
50x RPMI <i>Aminoacids Mix</i>	1x	Sigma
MES	25 mM	Sigma
Rojo fenol	0.0004%	Sigma
<i>Heat Inactivated-FBS</i>	20%	PAA

Las células THP-1 (monocitos leucémicos humanos) fueron proporcionadas por GSK (*Biological Reagents and Assay Development Department*, BRAD, Stevenage, UK) y mantenidas mediante pase bisemanal a una densidad de 3x10<sup>5</sup> células/mL en medio “TM” cuya composición se recoge a continuación en la Tabla 6.

**Tabla 6. Composición del medio TM para el cultivo de células THP-1.**

Este medio se filtra a 0.22 µm para asegurar su esterilidad.

Reactivo	Concentración	Casa Comercial
RPMI Medium 1640	-	Invitrogen
<i>Heat Inactivated</i> -FBS	10%	PAA
Hepes	25 mM	Invitrogen
Piruvato sódico	1.25 mM	Invitrogen
L-Glutamina	2.5 mM	Invitrogen

Las células LLC-MK2 (células epiteliales de riñón de mono verde) se obtuvieron de *European Cell Cultures Collection* (referencia 85062804) y se emplearon para la expansión de *T. cruzi*. El mantenimiento de las células LLC-MK2 se realiza mediante pases bisemanales en medio "MK2" a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/Tflask cuya composición se recoge a continuación en la Tabla 7.

**Tabla 7. Composición del medio para el mantenimiento del cultivo celular de LLC-MK2.**

Este medio se filtra a 0.22 µm para asegurar su esterilidad.

Reactivo	Concentración	Casa Comercial
DMEM, Glucosa, Piruvato	-	Invitrogen
<i>Heat Inactivated</i> -FBS	10% (v/v)	Biowest
Penicilina/Estreptomicina	2% (v/v)	Lonza

El parásito *Trypanosoma cruzi* de la cepa Tulahuen que expresa β-galactosidasa fue proporcionado por el Dr. Buckner (University of Washington, Seattle, USA). El cultivo de *T. cruzi* se mantiene mediante infección semanal de las células LLC-MK2 empleando medio MK2 con un 2% de FBS y la forma tripomastigote se aísla del sobrenadante del cultivo celular durante los días 5 a 9 de infección. Para el aislamiento y purificación de tripomastigotes se centrifuga el sobrenadante del cultivo de LLC-MK2 a 300 g, 5 minutos a temperatura ambiente, separando los restos celulares de mayor tamaño, y seguidamente se recoge y se centrifuga el sobrenadante resultante a 1610 g, 10 minutos a temperatura ambiente. El resultado de esta centrifugación se incuba durante 4 horas durante las cuales las formas tripomastigote del parásito nadan del *pellet* al sobrenadante (Bettioli et al. 2009).

Las células NIH-3T3 (fibroblastos endoteliales de ratón) fueron proporcionadas por GSK y se conservaron congeladas a -150 °C hasta su utilización.

Las células H9c2 (cardiomiocitos de rata) se obtuvieron de Sigma (referencia 88092904) y fueron mantenidas mediante el pase bisemanal a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/Tflask en medio “H9c2” cuya composición se recoge a continuación en la Tabla 8.

**Tabla 8. Composición del medio para el mantenimiento del cultivo celular de H9c2.**

Este medio se filtra a 0.22  $\mu\text{m}$  para asegurar su esterilidad.

Reactivo	Concentración	Casa Comercial
DMEM, Glucosa, Piruvato	-	Invitrogen
<i>Heat Inactivated-FBS</i>	10% (v/v)	Biowest
Penicilina/Estreptomicina	2% (v/v)	Lonza

Las células HepG2 (hepatoma humano) fueron proporcionadas por GSK y mantenidas mediante el pase bisemanal a una densidad de  $5 \times 10^6$  células/Tflask en medio “HepG2”, descrito en la Tabla 9.

**Tabla 9. Composición del medio de cultivo de HepG2.**

Este medio se filtra a 0.22  $\mu\text{m}$  para asegurar su esterilidad.

Reactivo	Concentración	Casa Comercial
MEM	-	Gibco
MEM <i>non- essential aminoacids</i>	1x	Gibco
<i>Heat Inactivated-FBS</i>	10% (v/v)	Gibco

### 3.2. COLECCIÓN DE COMPUESTOS

La colección de aproximadamente 150 000 compuestos fue proporcionada por Calibr (*California Institute for Biomedical Research*, La Jolla, California) predispensada en las placas de ensayo multipocillo recogidas en la Tabla 10.

**Tabla 10. Tipo de placa multipocillo y volúmenes de compuesto usados para cada ensayo.**

Ensayo	Placa	N.º pocillos	Volumen de compuesto
Axénico	Greiner ref. 782092	1536	30 nL
InMac	Greiner ref. 781091	384	250 nL
$\beta$ -galactosidasa	Greiner ref. 782092	1536	30 nL
Imaging	Greiner ref. 781091	384	250 nL
Tripomastigotes	Greiner ref. 781074	384	250 nL
Citotoxicidad (HepG2)	Greiner ref. 781091	384	250 nL

Para la preparación de las placas de ensayo se utiliza el equipo Echo Liquid Handler (Labcyte) que permite la transferencia de compuesto desde la placa madre a las placas de ensayo sin que exista contacto físico entre las muestras y, por tanto, minimiza el riesgo de contaminación cruzada. Este equipo permite además realizar un control de calidad del proceso de dispensación, reportando pocillos vacíos si los hubiera, así como detectando las muestras que no pueden ser dispensadas al estar, por ejemplo, precipitadas o contener volumen insuficiente.

En todos los casos se añadieron los compuestos disueltos en DMSO, 250 nL de compuesto en las placas de 384 y 30 nL en las placas de 1536 pocillos. Para los ensayos a una sola concentración, denominados también de *single-shot* (SS), se testan los compuestos a 5  $\mu$ M. Para la determinación de la potencia de los compuestos en los ensayos de dosis respuesta (DR), se generan diluciones seriadas 1/3 de 11 puntos, siendo la primera concentración ensayada de 50  $\mu$ M, excepto en el ensayo de citotoxicidad con HepG2, en el que la concentración de partida es de 100  $\mu$ M. Siendo todas las concentraciones indicadas las finales para los diferentes ensayos.

La distribución de las muestras en las placas para los diferentes ensayos sigue siempre el mismo esquema. En las placas de 384 pocillos, la columna 6 corresponde a muestras control no tratadas o “control 1” (0% de inhibición del crecimiento), mientras que la columna 18 corresponde al “control 2” (100% de inhibición del crecimiento). Del mismo modo, en las placas de 1536 pocillos, el control 1 se sitúa en las columnas 11 y 12, mientras que el control 2 lo hace en las

columnas 35 y 36. Los pocillos correspondientes a los controles contienen la misma cantidad de DMSO que las muestras.

Para el experimento del efecto de los compuestos en combinación con benznidazol se dispensaron los compuestos disueltos en DMSO en las placas de ensayo utilizando el equipo Tecan D300e Digital Dispenser, que permite la dispensación de volúmenes entre pL y  $\mu$ L sin contacto sobre la placa utilizando la tecnología HP Direct Digital Dispensing. En este caso los pocillos correspondientes al control 1 se sitúan en la columna 12 y los de control 2 en la columna 24 de la placa. Se dispensa una dosis cruzada de benznidazol (7 puntos, dilución seriada comenzando en 50  $\mu$ M y finalizando en 0.25  $\mu$ M, y un punto a 0  $\mu$ M) frente a una dosis del compuesto a estudiar (10 puntos, dilución seriada comenzando en 20  $\mu$ M y finalizando en 0.04  $\mu$ M, y un punto a 0  $\mu$ M). El efecto de esta combinación se estudia en el ensayo *Rate of Kill* descrito en el punto 3.4.3 de esta Tesis. Estas concentraciones son elegidas a partir de la  $IC_{50}$  de cada uno de los compuestos, situando dicho valor en una posición centrada de la dosis, de manera que en el experimento pueda verse un posible efecto sinérgico. En ambos casos se estudia el efecto del compuesto en ausencia del otro.

### 3.3. CASCADA DE PROGRESIÓN DE ENSAYOS FRENTE A *LEISHMANIA DONOVANI*

Para el cribado de los compuestos frente a *L. donovani* se utiliza la cascada de progresión descrita en la Figura 20.

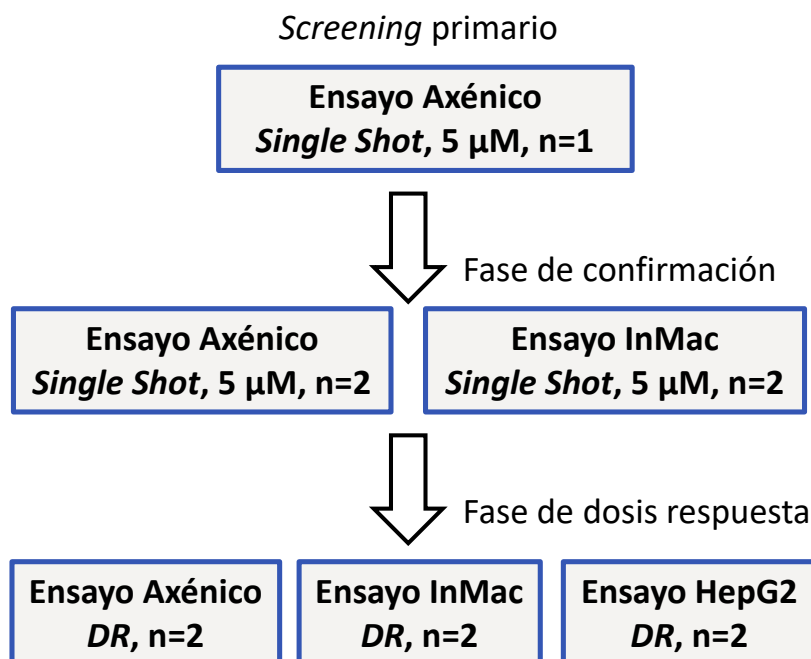


Figura 20. Cascada de progresión de ensayos para el *screening* de compuestos frente a *Leishmania donovani*.

#### 3.3.1. ENSAYO AXÉNICO

Los amastigotes de *L. donovani* en cultivo axénico se recogen, fijan y cuentan con el contador celular CASY (Roche-Applied Science). Se prepara una solución de amastigotes en medio de ensayo axénico (Tabla 11) a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/mL. Se dispensan 6  $\mu$ L por pocillo de esta solución de amastigotes utilizando el dispensador Multidrop Combi dispenser (Thermo Scientific). Como control de 100% de inhibición del crecimiento se dispensan 6  $\mu$ L de medio de ensayo en las columnas de control 2.

Posteriormente, tras una incubación de 72 h a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, se añaden 2  $\mu$ L por pocillo de una disolución de resazurina (Sigma) a una concentración final de 0.2  $\mu$ M en PBS (*Phosphate Buffered Saline*) con 0.2% (v/v) de IGEPAL (Sigma). Tras 4 horas de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad se procede a la detección de fluorescencia en un lector EnVision (PerkinElmer) con excitación a 528 nm y emisión a 590 nm (Figura 21) (De Rycker et al. 2013, Peña et al. 2015).

**Tabla 11. Composición del medio de ensayo axénico.**

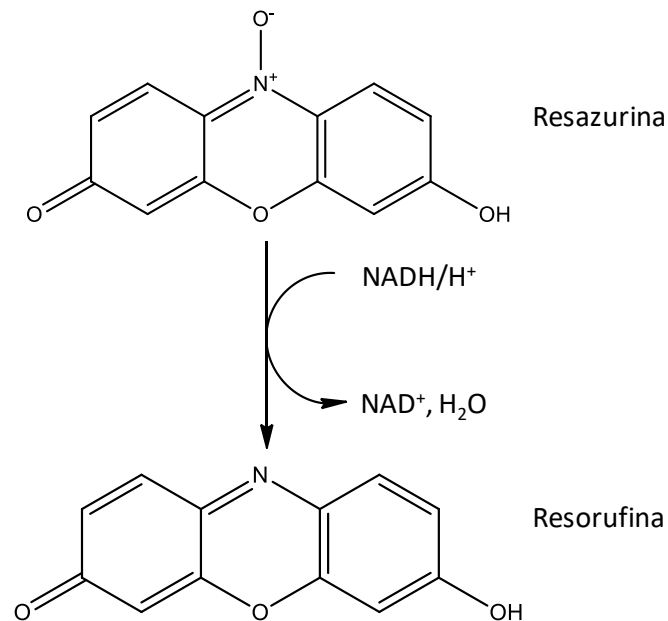
Este medio se filtra a 0.22 µm para asegurar su esterilidad.

Reactivo	Concentración	Casa Comercial
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136 mM	Merck
MgSO <sub>4</sub>	0.5 mM	Merck
KCl	15 mM	Invitrogen
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	24 mM	Invitrogen
Glucosa	25 mM	Sigma
L-Glutamina	1 mM	Invitrogen
100 x RPMI Vitamin solution	1x	Sigma
Ácido Fólico	10 µM	Sigma
Adenosina	100 µM	Sigma
Hemina	5 mg/L	Fluka
50x RPMI Aminoacids Mix	1x	Sigma
MES	25 mM	Sigma
Penicilina/Estreptomicina	500 U/mL	Sigma
Heat Inactivated-FBS	20%	PAA



**Figura 21. Esquema del protocolo de ensayo axénico de *Leishmania donovani*.**

La resazurina es un indicador redox que al pasar del estado oxidado (no fluorescente) al estado reducido, emite fluorescencia (Figura 22). El crecimiento celular genera un entorno reductor, por lo que este indicador puede emplearse para medir la viabilidad de un cultivo con un detector de fluorescencia.



**Figura 22. Reacción de reducción de la resazurina.**

### 3.3.2. ENSAYO INMAC (INTRA MACRÓFAGO)

Las células THP-1 se cultivan a una concentración inicial de  $3 \times 10^5$  células/mL en el medio TM descrito previamente (Tabla 6) en botellas de 2 L CELLMASTER (Greiner ref. #680048) en un “low-profile roller” (Sigma) a velocidad de una vuelta por minuto durante 72 h. Posteriormente las células se monitorizan utilizando un microscopio óptico y se cuentan con el contador celular CASY para proceder a su diferenciación en Tflask de 225 cm<sup>2</sup> en presencia de 30 nM de PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate, Sigma) a la concentración de  $6 \times 10^5$  células/mL. Tras una incubación de 24 h a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, la diferenciación celular se comprueba visualmente con un microscopio óptico. Las células se lavan con medio de cultivo TM y posteriormente se infectan con amastigotes de *L. donovani* a una MOI (*Multiplicity of Infection*) de 10 en el Tflask que contiene las células diferenciadas. Tras una incubación *overnight* la infección se lava con PBS. Las células infectadas se levantan mediante el tratamiento con tripsina al 0.05% con 0.48 mM EDTA (Gibco), seguidamente se neutraliza la acción de la tripsina con medio de cultivo TM con FBS al 10% y se recogen las células. La concentración de células se calcula mediante el uso del contador CASY y se prepara una solución de células THP-1 infectadas de  $2 \times 10^5$  células/mL en medio de plaqueo (Tabla 12). Esta solución de células infectadas se dispensa en las placas de ensayo con un volumen de 50 µL por pocillo utilizando el dispensador Multidrop Combi dispenser (Thermo Scientific). Como control de 100% de inhibición del crecimiento se utiliza una solución de células no infectadas a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/mL en medio de plaqueo.

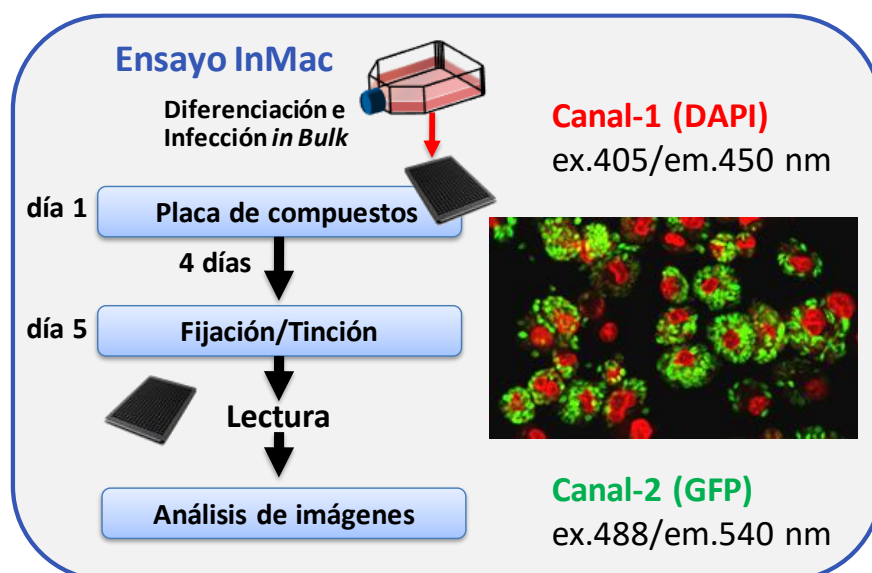
**Tabla 12. Composición del medio de plaqueo para el ensayo InMac.**

Este medio se filtra a 0.22 µm para asegurar su esterilidad.

Reactivo	Concentración	Casa Comercial
RPMI Medium 1640	-	Invitrogen
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	25 mM	Invitrogen
<i>Heat Inactivated</i> -FBS	2% (v/v)	Gibco
PMA	30 nM	Sigma

Tras la incubación durante 96 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, las placas se fijan utilizando una solución al 4% (v/v) de formaldehído/PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, las placas se lavan dos veces con 100 µL de PBS utilizando un EL406 Multi well Platewasher (BioTek), posteriormente son teñidas durante 30 minutos a temperatura ambiente con DAPI (10 mg/mL) en PBS con 0.1% (v/v) de Triton X-100 y lavadas con 50 µL de PBS (Figura 23) (Peña et al. 2015, De Rycker et al. 2013).

Finalmente, se añaden 50 µL de PBS por pocillo y las placas se sellan y se leen en un microscopio Opera QEHS (PerkinElmer) utilizando el objetivo de 20x, con 3 campos por pocillo. En cada pocillo se toman dos imágenes utilizando una longitud de onda de excitación de 405 nm y de 488 nm.



**Figura 23. Esquema del protocolo de ensayo InMac de *Leishmania donovani*.**

El análisis automatizado de las imágenes se realiza con un *script* desarrollado con Acapella High Content Imaging and Analysis Software (PerkinElmer). De cada pocillo se calculan los datos de

número de células (“Mac”), la media del número de amastigotes por célula (“AmMac”) y el porcentaje de células infectadas (“InfCel”) siguiendo los pasos descritos a continuación:

- Adquisición de las imágenes de microscopía confocal del lector Opera QEHS (Figura 24. A)
- Selección de los núcleos de los macrófagos (Figura 24. B) y sus citoplasmas (Figura 24. C) gracias a la tinción con DAPI. Las células cuyos núcleos se encuentren en el borde de la imagen no son tenidas en cuenta para el análisis.
- Identificación de los puntos (*spots*) intracelulares correspondientes a los amastigotes de *L. donovani* basada en la detección de GFP y características como el área y la forma. En primer lugar, se emplea una técnica muy inclusiva de identificación de *spots* (Figura 24. D) para posteriormente proceder a una selección de los verdaderos amastigotes intracelulares (Figura 24. E).
- Aquellas células con uno o más amastigotes en su citoplasma se consideran infectadas (rojo) (Figura 24. F).

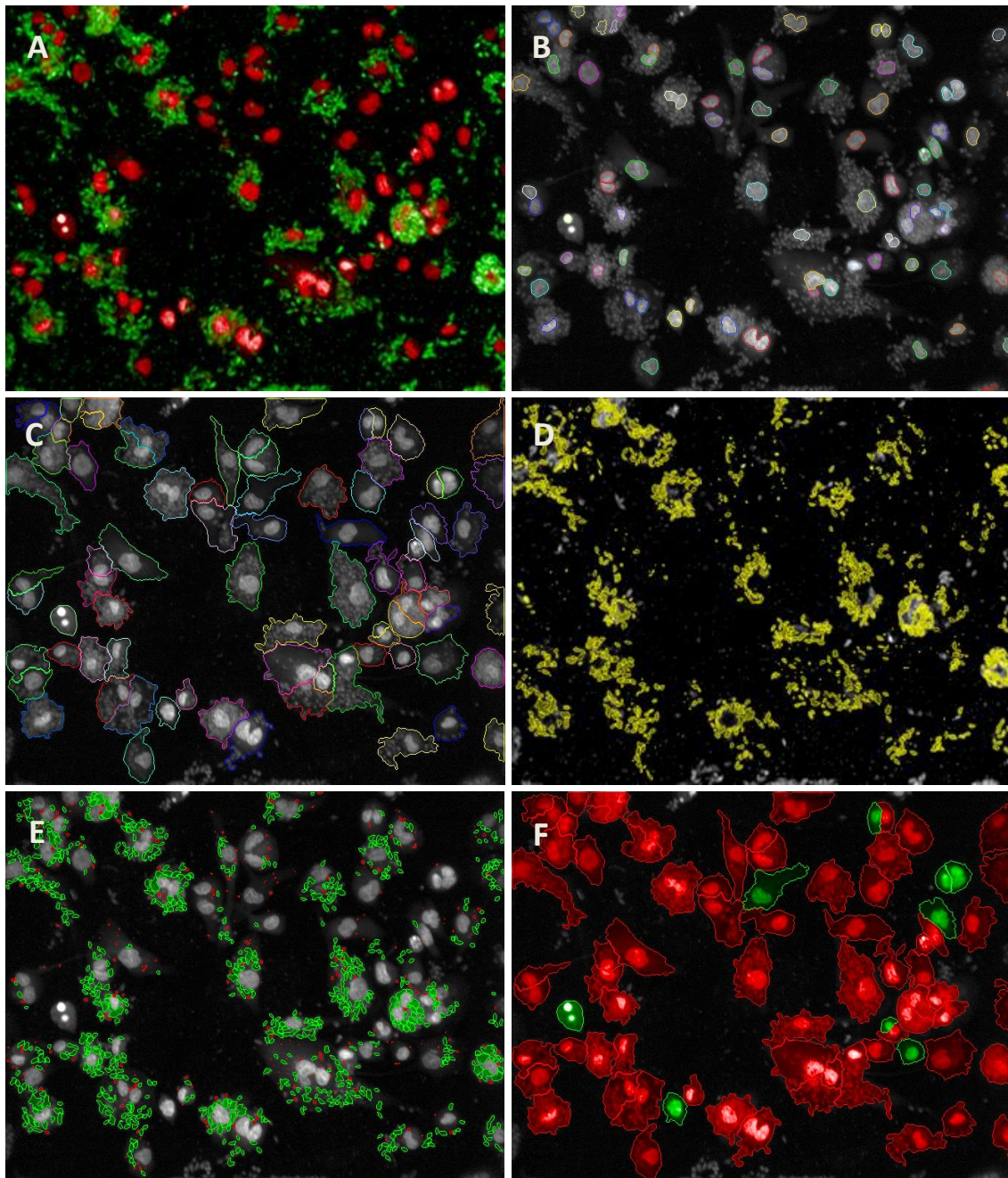


Figura 24. Análisis de datos del ensayo InMac de *L. donovani* mediante el *script* desarrollado en Acapella.

### 3.3.3. ENSAYO INMAC HS (INTRA MACRÓFAGO CON HORSE SERUM)

El procedimiento de este ensayo es igual que en el ensayo InMac descrito en el punto anterior, pero emplea en el medio de plaqueo 2% de Horse Serum (Gibco) en lugar de FBS. La lectura de las placas se realiza siguiendo el mismo protocolo y se obtienen tres datos correspondientes al número de macrófagos (“Mac-HS”), la media del número de amastigotes por célula (“AmMac-HS”) y el porcentaje de células infectadas (“InfCel-HS”) (Tegazzini et al. 2016).

### 3.3.4. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD HEPG2

Las células HepG2 son recogidas utilizando medio "HepG2" (Tabla 9) con 1% de Penicilina/Estreptomicina. Se prepara una suspensión de células de densidad  $1.2 \times 10^5$  células/mL en el mismo medio y se dispensan 25  $\mu$ L por pocillo utilizando el Multidrop Combi dispenser (Thermo Scientific). Como control 2 se utiliza digitoxina 100  $\mu$ M en DMSO. Tras la incubación de las placas durante 48 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, se dispensan 25  $\mu$ L por pocillo del reactivo CellTiter-Glo (Promega) y tras una incubación de 10 minutos se procede a la detección de luminiscencia utilizando el lector Wallac ViewLux 1430 ultraHTS (PerkinElmer). Los parámetros del lector son fijados de la siguiente manera: tiempo de exposición 5 s, velocidad de lectura 10  $\mu$ s, filtro de emisión 613 + 55 nm (Figura 25).



Figura 25. Esquema del protocolo de ensayo de HepG2.

El CellTiter-Glo es un reactivo comercial basado en la detección de la producción de ATP por parte de las células metabólicamente activas mediante la transformación de la luciferina en oxiluciferina catalizada por la luciferasa (Figura 26). La luminiscencia generada por la oxiluciferina puede ser cuantificada con un detector de luminiscencia. La señal será proporcional a la cantidad de ATP presente, que a su vez es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo.

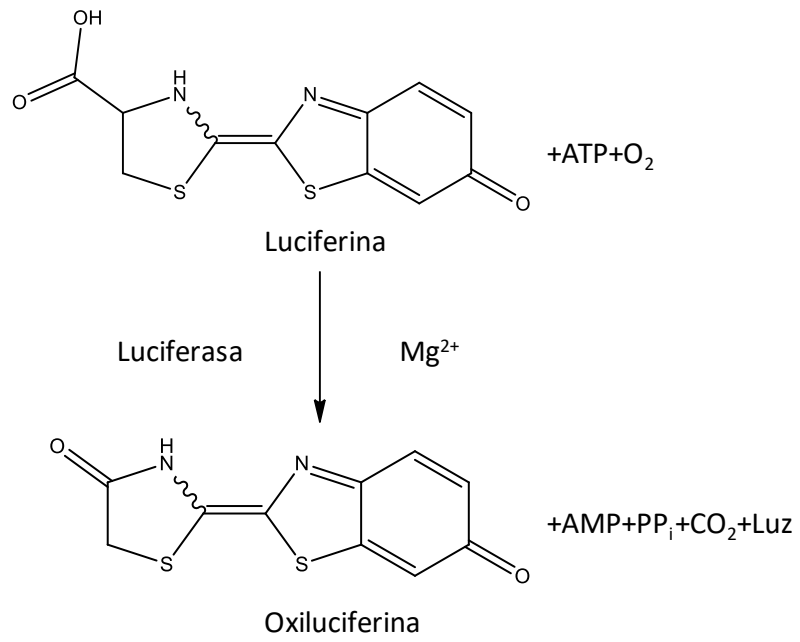


Figura 26. Reacción de luciferina/luciferasa para la detección de ATP.

### 3.4. CASCADA DE PROGRESIÓN DE ENSAYOS FRENTE A *T. CRUZI*

Para el cribado de los compuestos frente a *T. cruzi* se utiliza la cascada de progresión descrita en la Figura 27.

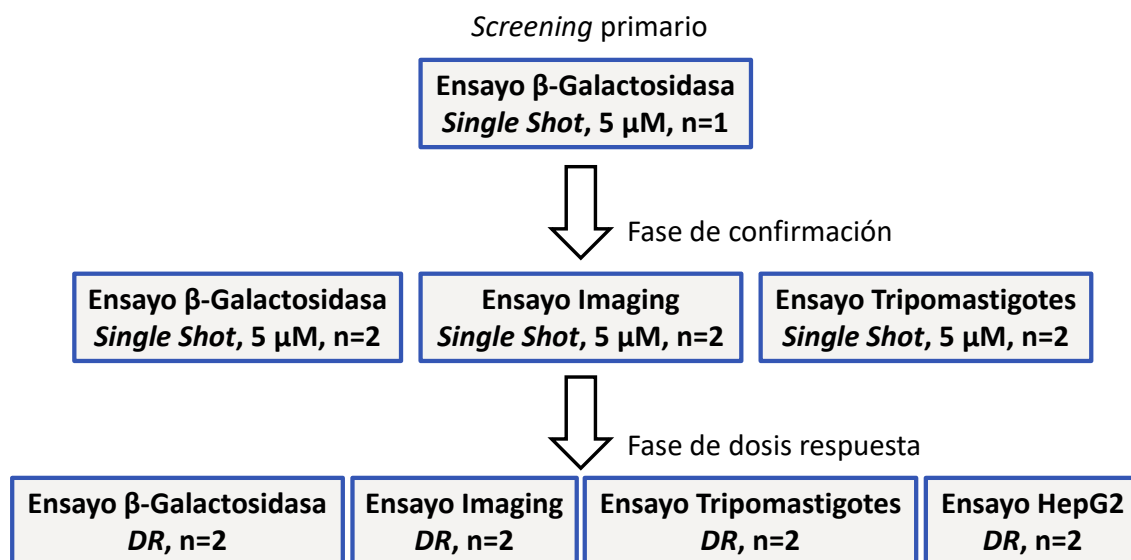


Figura 27. Cascada de progresión de ensayos para el *screening* de compuestos frente a *Trypanosoma cruzi*.

#### 3.4.1. ENSAYO DE $\beta$ -GALACTOSIDASA

Para la realización de este ensayo se prepara una solución de células 3T3 a  $3.33 \times 10^5$  células/mL en medio de ensayo (Tabla 13) y una solución de tripomastigotes de las mismas características, que posteriormente se mezclan en proporción 1:1 y se dispensan 6  $\mu$ L por pocillo en las placas de ensayo utilizando el dispensador Multidrop Combi dispenser (Thermo Scientific).

Tabla 13. Composición del medio de ensayo de  $\beta$ -galactosidasa.

Este medio se filtra a 0.22  $\mu$ m para asegurar su esterilidad.

Reactivo	Concentración	Casa Comercial
DMEM	-	Invitrogen
L-Glutamina/Penicilina/Estreptomicina	1%	Sigma
<i>Heat Inactivated</i> -FBS	2% (v/v)	Biowest
Hepes	25 mM	Invitrogen
Piruvato sódico	1 mM	Invitrogen

Como control de 100% de inhibición del crecimiento se utiliza una solución  $1.67 \times 10^5$  tripomastigotes/mL en ausencia de células 3T3 en medio de ensayo y se dispensan 6  $\mu$ L por pocillo en las columnas correspondientes al control 2. Tras la incubación durante 4 días a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, las placas se revelan mediante la adición de 2  $\mu$ L por pocillo de resorufin- $\beta$ -D-galactopiranosido (Sigma) a una concentración de 5  $\mu$ M en PBS con 0.2% IGEPAL (Fluka). Tras 4 horas de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad se procede a la detección de fluorescencia en un lector EnVision (PerkinElmer) con excitación a 531 nm y emisión a 595 nm (Figura 28).

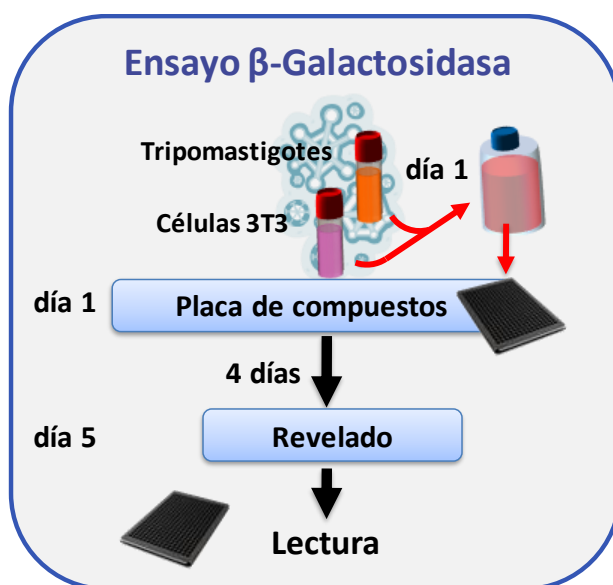


Figura 28. Esquema del protocolo de ensayo de  $\beta$ -galactosidasa de *Trypanosoma cruzi*.

El fundamento de este ensayo reside en la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa por parte de los parásitos (Buckner et al. 1996). Esta enzima cataliza la reacción que se muestra en la Figura 29, en la que se libera resorufina, un producto fluorescente. La fluorescencia es proporcional al crecimiento parasitario.

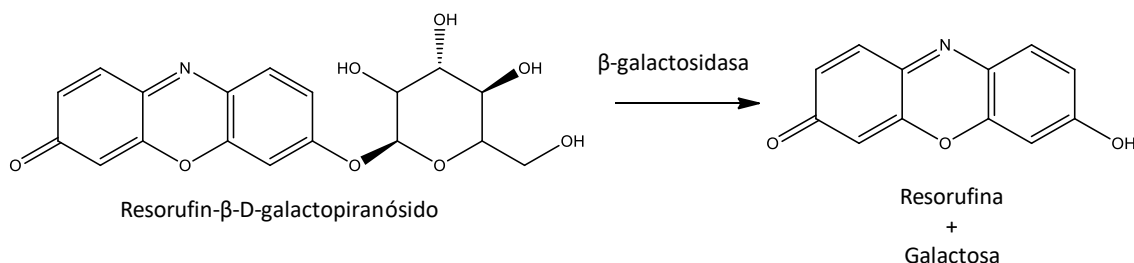


Figura 29. Reacción catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa.

### 3.4.2. ENSAYO DE IMAGING INTRACELULAR EN H9c2

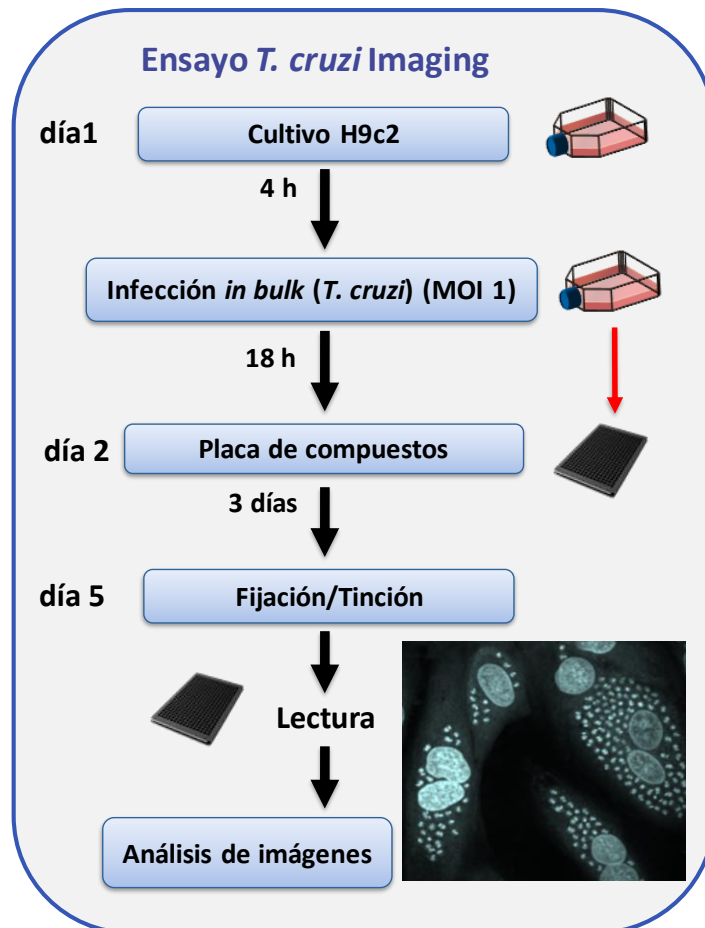
Las células H9c2 se siembran en Tflask de 225 cm<sup>2</sup> (Corning) en medio “H9c2” (Tabla 8) y se incuban durante 4 horas para permitir la adhesión de las mismas. Tras esta incubación las células son lavadas con PBS y posteriormente infectadas con tripomastigotes. Estos tripomastigotes son recogidos del cultivo infectado de LLC-MK2 entre los días 5 y 8 de infección utilizando el método de purificación descrito anteriormente. Los tripomastigotes son contados con el contador celular CASY y añadidos sobre el cultivo de H9c2 en medio de ensayo de Imaging (Tabla 14) a una MOI de 1. Estos cultivos de H9c2 infectados son incubados durante 18 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente las células son lavadas con PBS y recogidas mediante el tratamiento con tripsina (Life-Technologies), que se inactiva con medio de ensayo. Las células son contadas con el contador CASY y se prepara una solución a una densidad de 5x10<sup>4</sup> células/mL en medio de ensayo de Imaging. Utilizando el Multidrop Combi dispenser (Thermo Scientific) se dispensan 50 µL por pocillo de esta solución de células H9c2 infectadas. Como control del 100% de inhibición del crecimiento se dispensan células H9c2 no infectadas en las columnas correspondientes. Las placas son incubadas durante 72 horas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabla 14. Composición del medio de ensayo de Imaging.**

Este medio se filtra a 0.22 µm para asegurar su esterilidad.

Reactivo	Concentración	Casa Comercial
DMEM	-	Invitrogen
Penicilina/Estreptomicina	200 U/mL	Biochrom
L-Glutamina	2 mM	Sigma
<i>Heat Inactivated</i> -FBS	2% (v/v)	Biowest
Hepes	25 mM	Invitrogen
Piruvato sódico	1 mM	Invitrogen

Tras la incubación se fija y tiñe el contenido de las placas mediante la dispensación de 50 µL por pocillo de una solución de formaldehído al 8% y DRAQ5 4 µM (BioStatus, UK) en PBS (Figura 30).



**Figura 30. Esquema del protocolo del ensayo de Imaging intracelular de *Trypanosoma cruzi*.**

Tras la tinción, las placas se sellan y se leen en un microscopio Opera QEHS (PerkinElmer) utilizando el objetivo de 20x, con 5 campos por pocillo utilizando el láser de excitación a 635 nm y el filtro de detección de la emisión a 690/50 nm. El análisis automatizado de las imágenes se realiza con el *script* descrito a continuación, desarrollado con Acapella High Content Imaging and Analysis Software (PerkinElmer) (Alonso-Padilla et al. 2015).

- Adquisición de las imágenes de microscopía confocal del lector Opera QEHS (Figura 31. A)
- Selección de los núcleos de las células H9c2 basado en intensidad, área y características morfológicas (Figura 31. B). Las células cuyos núcleos se encuentran en el borde de la imagen (rojo) no se tienen en cuenta para el análisis (Figura 31. C).
- Determinación de los citoplasmas de las células considerando los núcleos seleccionados previamente y teniendo en cuenta como límite celular (amarillo) las zonas en las que la intensidad de la señal del DRAQ5 es igual que el fondo (Figura 31. D).
- Identificación de los puntos (*spots*) intracelulares correspondientes a los amastigotes de *T. cruzi* en la región determinada en el paso anterior (Figura 31. E). En primer lugar, se

emplea una técnica muy inclusiva de identificación de *spots* para posteriormente proceder a una selección de los verdaderos amastigotes (Figura 31. F) mediante las propiedades de intensidad y área (Figura 31. G).

- Aquellas células con dos o más amastigotes en su citoplasma se considerarán infectadas (verde). Por lo tanto, aquellas con uno o ningún amastigote se identifican como no infectadas (rojo) (Figura 31. H)
- De cada pocillo se calculan los datos de número de células ("H9c2"), la media del número de amastigotes por célula ("AmCel") y el porcentaje de células infectadas ("InfCel").

#### 3.4.3. ENSAYO DE RATE OF KILL

Para la realización de este ensayo se sigue el protocolo descrito para el ensayo *Imaging* en el punto 3.4.2 pero empleando una MOI de 7. Es un ensayo cinético en el que cada compuesto se ensaya 4 veces, en placas diferentes, que se revelan tras 4, 24, 48 y 72 horas de incubación. La lectura y el análisis de imágenes de las placas sigue el mismo protocolo que el ensayo de *Imaging*. En este ensayo se emplean siempre como referencia los resultados de los compuestos estándares benznidazol, nifurtimox y posaconazol.

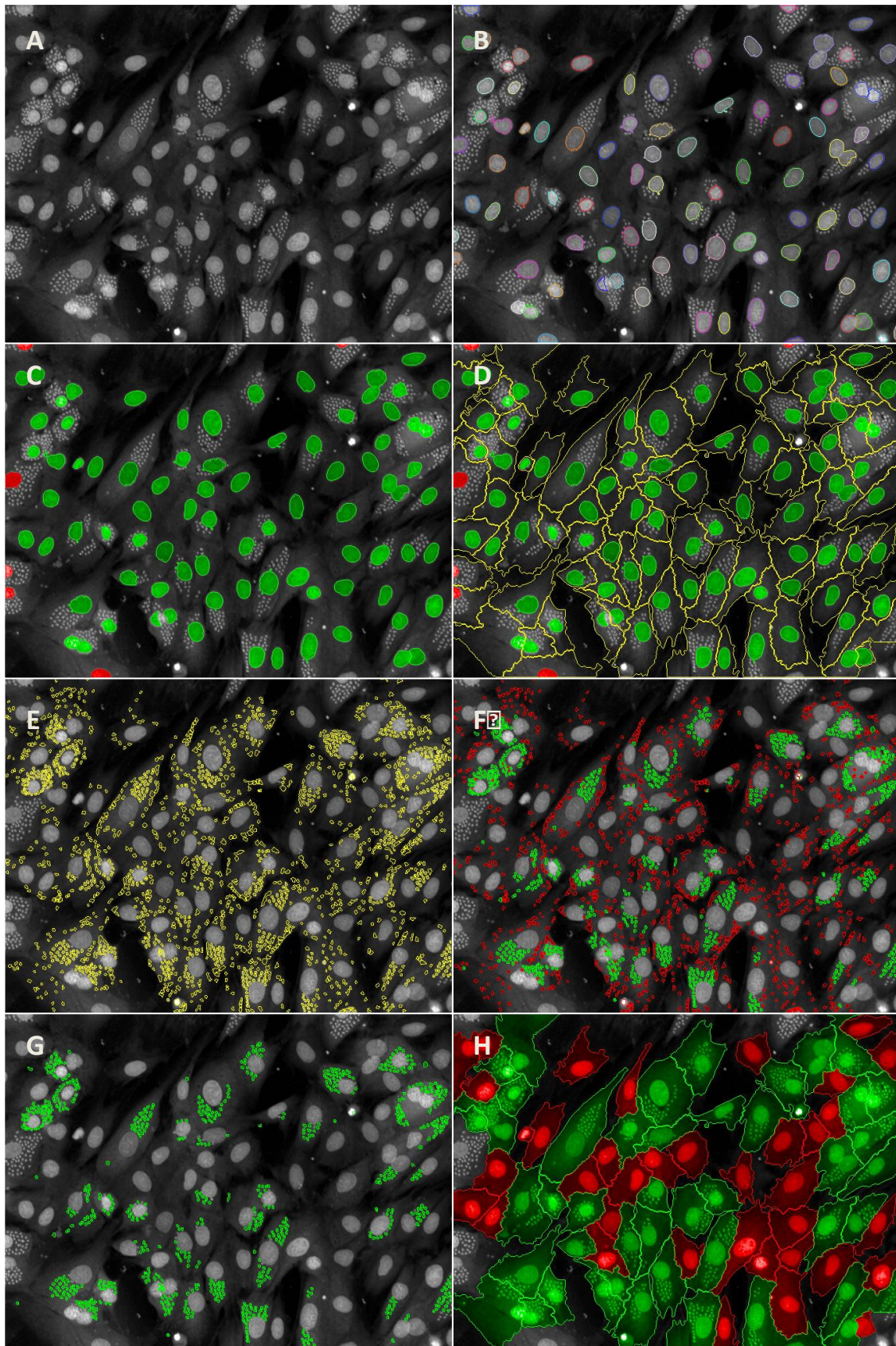


Figura 31. Análisis de datos del ensayo de Imaging de *T. cruzi* mediante el *script* desarrollado en Acapella.

#### 3.4.4. ENSAYO DE TRIPOMASTIGOTES

Para la realización de este ensayo se dispensan 50  $\mu\text{L}$  de una solución de  $1 \times 10^6$  tripomastigotes/mL en medio de cultivo "MK2" al 2% de FBS mediante el uso del Multidrop Combi dispenser (Thermo Scientific). La columna correspondiente al control 2 (100% de inhibición) contiene 50  $\mu\text{L}$  por pocillo de medio de cultivo MK2 al 2% de FBS. Tras la dispensación las placas son incubadas durante 24, 48 o 72 horas a 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  y posteriormente reveladas con la adición de 50  $\mu\text{L}$  de CellTiter-Glo (Promega). Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente para la estabilización de la señal luminiscente, las placas se leen en un lector EnVision (PerkinElmer) empleando la apertura de luminiscencia para placas de 384 pocillos (Figura 32) (MacLean 2018).



Figura 32. Esquema del protocolo del ensayo de tripomastigotes de *T. cruzi*.

### 3.5. ANÁLISIS DE DATOS

Los datos son analizados utilizando el programa ActivityBase XE (IDBS). Los valores obtenidos para cada compuesto son normalizados mediante el cálculo del porcentaje de inhibición de la respuesta biológica utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{Respuesta} = \frac{|\text{Rctrl1} - \text{Rx}|}{|\text{Rctrl1} - \text{Rctrl2}|} \times 100$$

Siendo Rx el valor de lectura obtenido en el ensayo para un compuesto X, Rctrl1 la media de los valores de los controles 1 (0% de inhibición) y Rctrl2 el valor medio de los controles 2 (100% de inhibición) de la placa en la que se ensayó el compuesto X.

En los ensayos de dosis respuesta la potencia de los compuestos expresada como pIC<sub>50</sub> se obtiene utilizando la función de regresión no lineal en el sistema de análisis de curvas de dosis respuesta de ActivityBase XE.

$$\text{pIC}_{50} = -\log_{10} \text{IC}_{50}(\text{M})$$

Para el ajuste de las curvas se fija la asíntota mínima entre -20% y 20% de inhibición, la asíntota máxima entre 80% y 120% de inhibición y la pendiente entre 0.5 y 6. A pesar de tratarse de un análisis de datos automatizado, las curvas son revisadas y en caso necesario ajustadas manualmente siguiendo los mismos parámetros, para ello se permite la eliminación de hasta 4 puntos de la curva de dosis respuesta en ensayos de *High Content Imaging* y hasta 3 puntos en el resto de ensayos.

Para el análisis de la distribución de los *hits* (compuestos activos) y las visualizaciones de los diferentes resultados a lo largo del *screening* se utiliza el programa Spotfire DecisionSite (Spotfire, Inc.).

El análisis de datos de *Rate of Kill* se realiza empleando el programa Spotfire DecisionSite. Para la normalización de los datos se emplea como control 1 el valor medio de los pocillos correspondientes al control 1 en la placa de 4 horas y como control 2 el valor medio de la columna de control 2 para cada tiempo de incubación. Con los datos obtenidos para cada concentración de un compuesto dado, se realiza una gráfica cinética representando cada dato (AmCel, InfCel y H9c2) frente al tiempo (4, 24, 48 y 72 horas).

Para poder comparar de manera objetiva las curvas obtenidas de las cinéticas de los diferentes compuestos se desarrollan una serie de parámetros que se exponen a continuación en la comparativa entre los compuestos estándares nifurtimox y posaconazol (Figura 33):

- MCC: (*Minimum Cidal Concentration*) Concentración mínima cida (que alcanza el 50% de cidalidad) expresado en  $\mu\text{M}$ . (Figura 33. A y D)
- Max Efecto: máximo efecto alcanzado expresado en % de cidalidad. (Figura 33. A y D)
- CCE: (*Concentration Cidal Effect*) mínima concentración con efecto cida (independientemente del % de cidalidad alcanzado) expresado en  $\mu\text{M}$ . (Figura 33. A y D)
- T lag: tiempo hasta que empieza a disminuir la carga parasitaria expresado en horas. Puede obtenerse sobre la MCC (Tlag MCC) o sobre la concentración máxima (Tlag Cmax). (Figura 33. B y E)
- T 50% cida: tiempo hasta alcanzar el 50% de cidalidad expresado en horas. Puede obtenerse sobre la MCC (T 50% cida MCC) o sobre la concentración máxima (T 50% cida Cmax). (Figura 33. B y E)
- Cmin tox: Concentración mínima en la que se observa un número de células a las 48 horas por debajo de 200. (Figura 33. F)
- Cmin tox2: Concentración mínima cida que produce una disminución del número de células del 20% o mayor respecto al número inicial de las mismas. (Figura 33. F)

En función de la cinética observada los compuestos se clasifican como: inactivo, tóxico, estático o cida. En el caso de los compuestos estáticos, se puntualiza si el comportamiento es similar al observado para el posaconazol o no.

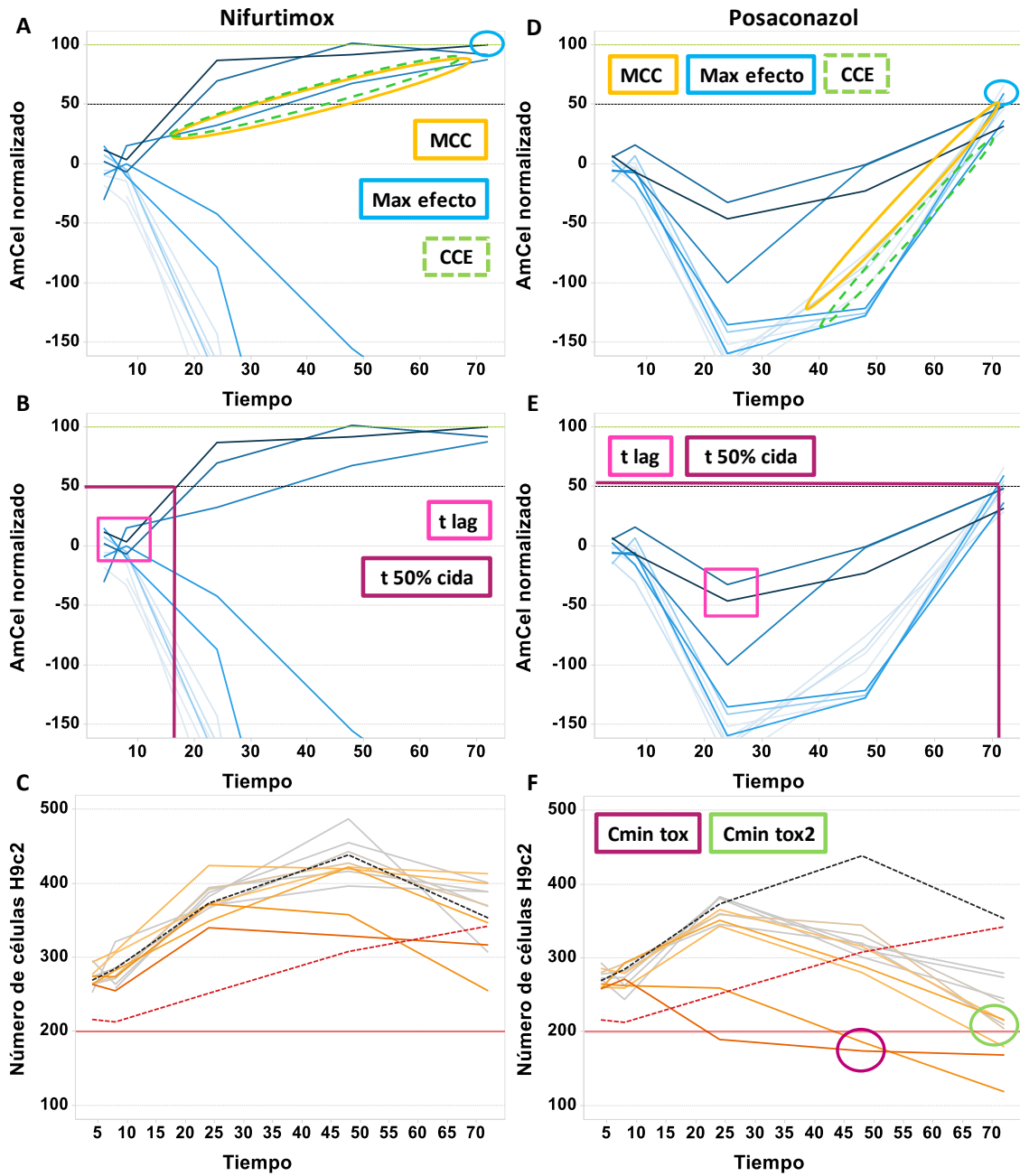


Figura 33. Gráficas de la cinética *Rate of kill* de los compuestos nifurtimox (A, B, C) y posaconazol (D, E, F). Representación de los parámetros para el análisis de *Rate of kill*.

En todas las gráficas el gradiente de color representa las diferentes concentraciones de compuesto de mayor a menor. Las gráficas A, B, D, y E representan el parámetro de eficacia AmCel (normalizado) frente al tiempo. En las gráficas de toxicidad, C y F, de número de células frente al tiempo, las líneas discontinuas negra y roja representan los controles 1 y 2 respectivamente.

### 3.5.1. CONTROL DE CALIDAD DE LOS ENSAYOS

El parámetro adimensional  $Z'$  se emplea en el campo del HTS como parámetro estadístico indicativo de la calidad del ensayo, al tener en cuenta tanto la media (AV) como la desviación estándar (SD) de los controles presentes en la placa (Zhang 1999). El valor  $Z'$  es, por tanto, un indicativo de la separación de las dos poblaciones de control. Para el cálculo del valor  $Z'$  de cada placa se utiliza la siguiente ecuación:

$$Z' = 1 - 3 \times \frac{(SD_{ctrl2} + SD_{ctrl1})}{|AV_{ctrl2} - AV_{ctrl1}|}$$

Se consideran valores de  $Z'$  aceptables aquellos mayores a 0.4.

Además de los parámetros estadísticos, en cada ensayo se incluye una placa de compuestos estándares en formato de dosis respuesta para comprobar la reproducibilidad de los datos, así como evaluar la respuesta farmacológica de compuestos de actividad conocida.

Como parte del control de calidad hay que tener en cuenta la integridad de los datos generados. Para asegurar la trazabilidad de los mismos a lo largo de todo el proceso, las placas de ensayo se marcan con un código de barras asociado a la información del contenido de la misma (código del compuesto, concentración y posición en la placa) durante su preparación. En la lectura de las placas, los archivos generados quedan asociados al código de barras correspondiente. A continuación, al adquirir los datos en el programa ActivityBase XE, estos quedan asociados automáticamente a los compuestos a través del código de barras, reduciendo al mínimo posible los fallos humanos y asegurando la integridad de los datos en las diferentes etapas del proceso.

### 3.5.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE *HITS*

Para la selección de *hits* en el ensayo primario se utiliza el *cut-off* estadístico calculado con la siguiente ecuación, siendo AV el valor medio (porcentaje de inhibición) de las muestras y SD su desviación estándar:

$$Hit\ cutoff = AV + (3 \times SD)$$

Por lo tanto, todo compuesto con un porcentaje de inhibición igual o superior a dicho *cut-off* será marcado como *hit* para dicho ensayo. Sin embargo, no hay que olvidar que en el proceso de selección de *hits* para las fases posteriores debe progresarse un número de compuestos cuyo estudio sea factible por razones de logística, por lo que, en determinados casos, puede elevarse

el *cut-off*. El porcentaje de compuestos marcados como *hits* para un determinado *cut-off* recibe el nombre de *hit rate* (HR).

A la hora de progresar *hits* a lo largo de la cascada de *screening* se tiene también en cuenta su toxicidad. Para ello se calcula el *Selectivity Index* (SI) como la diferencia de  $pIC_{50}$  entre un parámetro de eficacia y uno de toxicidad.

Por otra parte, se emplearon criterios estructurales y fisicoquímicos en la progresión de compuestos en la cascada de *screening*. Dichos parámetros fueron calculados por personal especializado en química de la *Kinetoplastids DPU* de GSK empleando programas informáticos desarrollados internamente en la compañía.

### **3.6. BIOSEGURIDAD Y MANEJO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS**

El trabajo experimental realizado con parásitos viables de las especies *Leishmania donovani* o *Trypanosoma cruzi* se lleva a cabo siguiendo protocolos normalizados de trabajo en laboratorios de nivel 3 de bioseguridad. Las células HepG2 y THP-1 son tratadas siguiendo las políticas de GSK respecto al manejo de muestras biológicas humanas.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



La mayor parte de los resultados que se exponen a continuación han sido publicados recientemente por la revista *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug resistance*, en formato *open access* (Roquero et al. 2019). La publicación completa se recoge en el anexo de esta Tesis Doctoral.

#### 4.1. SCREENING PRIMARIO

En la fase de *screening* primario se evaluaron un total de 150 000 compuestos procedentes de la colección de Calibr frente a *Leishmania donovani* y *Trypanosoma cruzi*. Los ensayos frente a sendos parásitos se realizaron según los protocolos descritos en la sección 3 de la presente Tesis Doctoral. En ambos casos se ensayaron un total de 109 placas de 1536 pocillos. Todos los compuestos fueron testados a una concentración final de 5  $\mu$ M. En cada día de ensayo se evaluó, además, una placa con compuestos estándares de actividad conocida en dichos ensayos, para determinar la calidad farmacológica de los experimentos, mediante la comparación de los resultados obtenidos con aquellos recogidos en la literatura o presentes en bases de datos internas.

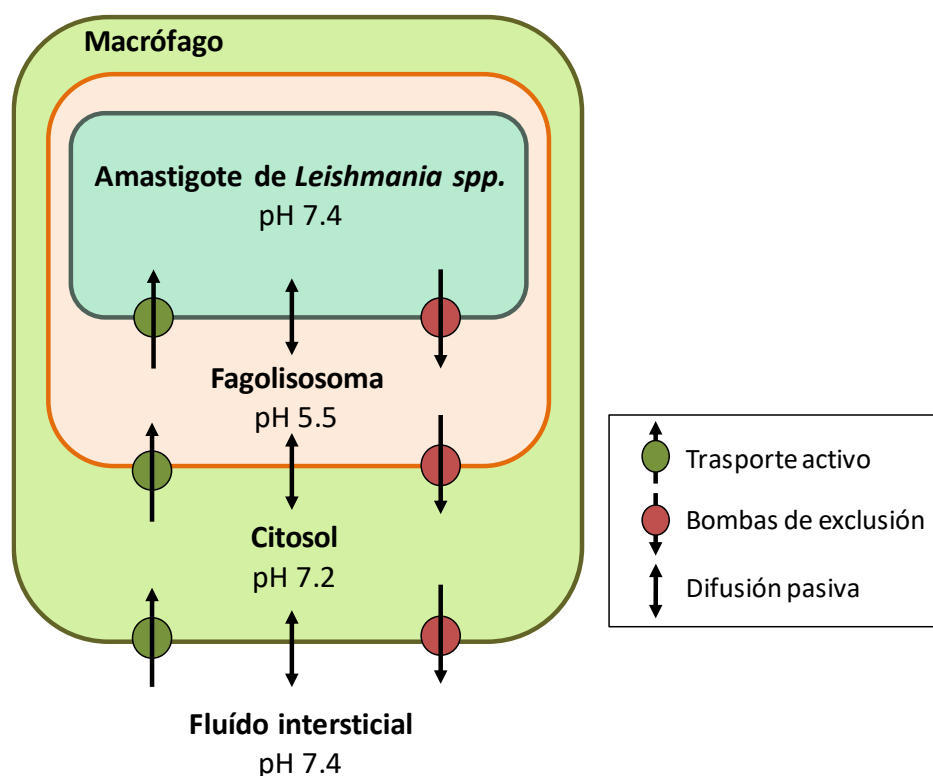
La selección de un ensayo *in vitro* biológicamente relevante en el contexto de la enfermedad es fundamental cuando se diseña una campaña de *screening*, ya que pueden existir diferencias significativas entre las distintas formas parasitarias en cuanto a la sensibilidad a los compuestos. Esto se traduce en mejores resultados en las fases posteriores de estudios preclínicos y clínicos. Sin embargo, en las fases iniciales de *screening* es necesario emplear ensayos con suficiente rendimiento y bajo coste, que permitan la evaluación de un gran número de compuestos (Martín, Cantizani, and Peña 2018, Macarrón and Hertzberg 2009).

##### 4.1.1. RESULTADOS DE SCREENING PRIMARIO FRENTE A *LEISHMANIA DONOVANI*

Para evaluar la actividad antiparasitaria de los compuestos es necesario reproducir, en la medida de lo posible, las condiciones de la enfermedad, teniendo en cuenta tanto la célula hospedadora como la etapa del ciclo de vida del parásito. En el caso de *L. donovani* la forma parasitaria más relevante en el contexto de la enfermedad es el amastigote (Martín, Cantizani, and Peña 2018).

El cribado primario de los compuestos frente a *L. donovani* se realizó mediante el ensayo axénico, descrito en la sección 3.3.1 de esta Tesis, que tiene la ventaja de ser un ensayo miniaturizado que emplea placas de 1536 pocillos, permitiendo el estudio de un gran número de compuestos con un menor coste en material fungible. Sin embargo, presenta como desventaja el uso de amastigotes axénicos, que se diferencian de los amastigotes intracelulares,

más relevantes en el estudio de la enfermedad, en cuanto a la expresión proteica y a la sensibilidad a fármacos. Además, este ensayo no permite identificar aquellos compuestos que actúan sobre la interacción parásito-célula hospedadora, ni tiene en cuenta las diferentes membranas permeables, mecanismos de transporte, ni gradientes de pH que existen entre el medio extracelular y el fagolisosoma (Figura 34) (De Rycker et al. 2013, Martín, Cantizani, and Peña 2018). Estas limitaciones son minimizadas mediante el empleo de otro tipo de ensayos en fases posteriores para la confirmación de la actividad de los compuestos seleccionados en el *screening* primario.



**Figura 34.** Representación de las diferentes membranas permeables, mecanismos de transporte a través de las mismas y variaciones de pH a los que se ve expuesto cualquier compuesto en su acción frente a amastigotes intracelulares (Martín, Cantizani, and Peña 2018).

En el cribado primario de los compuestos en este ensayo el valor medio de  $Z'$  de las placas de ensayo aceptadas como válidas tras el control de calidad fue de  $0.57 \pm 0.08$ . Como se muestra en la Figura 35, de las 109 placas, 7 obtuvieron valores de  $Z' < 0.4$ . De ellas, 4 fueron aceptadas considerando que los *hits* presentes en ellas podían ser asumidos sin alterar la logística de la fase de confirmación. Las 3 placas restantes fueron rechazadas y repetidas en fase de confirmación. Del mismo modo, una placa no pudo ser ensayada al sufrir daños durante el transporte entre las instalaciones de Calibr y GSK, y fue repetida en la siguiente fase de la cascada de progresión (Figura 37).

Entre los compuestos estándares ensayados para el control de calidad farmacológico se encuentran los compuestos anfotericina B y miltefosina, para los que se obtuvieron valores de  $pIC_{50}$  en este ensayo de  $6.29 \pm 0.29$  y  $5.33 \pm 0.10$ , respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados en la literatura para ensayos de amastigotes axénicos (De Rycker et al. 2013), quedando el ensayo validado a nivel farmacológico.

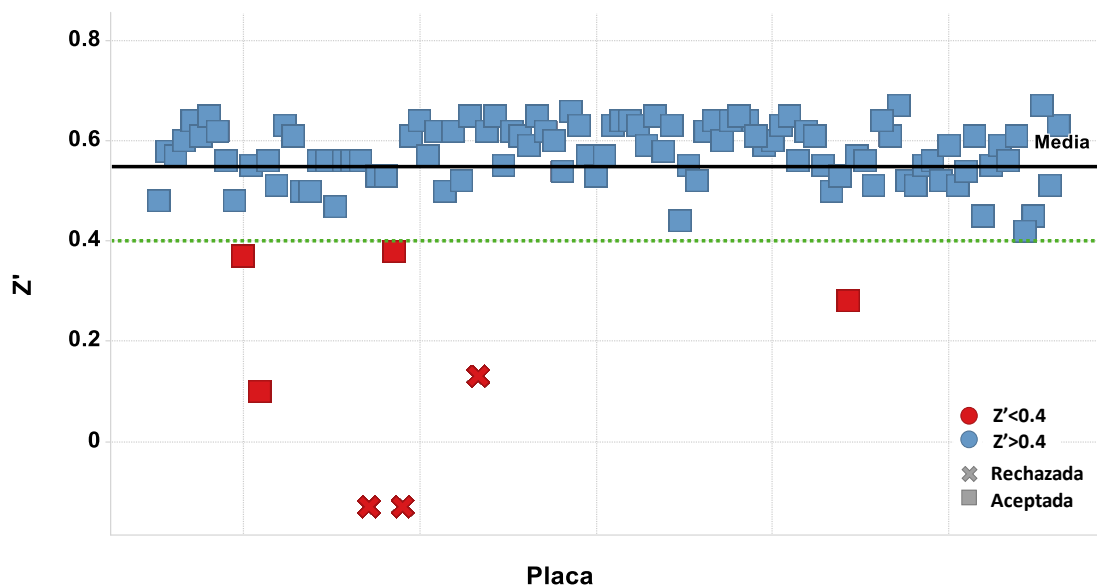


Figura 35. Distribución de valores de  $Z'$  de las placas ensayadas en el *screening* primario frente a *L. donovani*.

La línea discontinua verde representa el valor mínimo aceptable.

Considerando un *cut-off* estadístico del 35% de inhibición, 1392 compuestos fueron seleccionados para ser progresados a fase de confirmación, siendo por lo tanto el *hit rate* del 0.93% (Figura 36).

Cabe destacar que, en campañas de *screening* independientes llevadas a cabo por Novartis, GSK y la Universidad de Dundee se obtuvieron *hit rates* del 1 – 2% para ensayos de amastigotes axénicos (Martín, Cantizani, and Peña 2018). En todos los casos, el ensayo empleado selecciona compuestos tanto cidas como estáticos. El valor obtenido en este *screening* está, por tanto, en línea con el reportado en la literatura para la evaluación de otras colecciones de productos químicos en este tipo de ensayos.

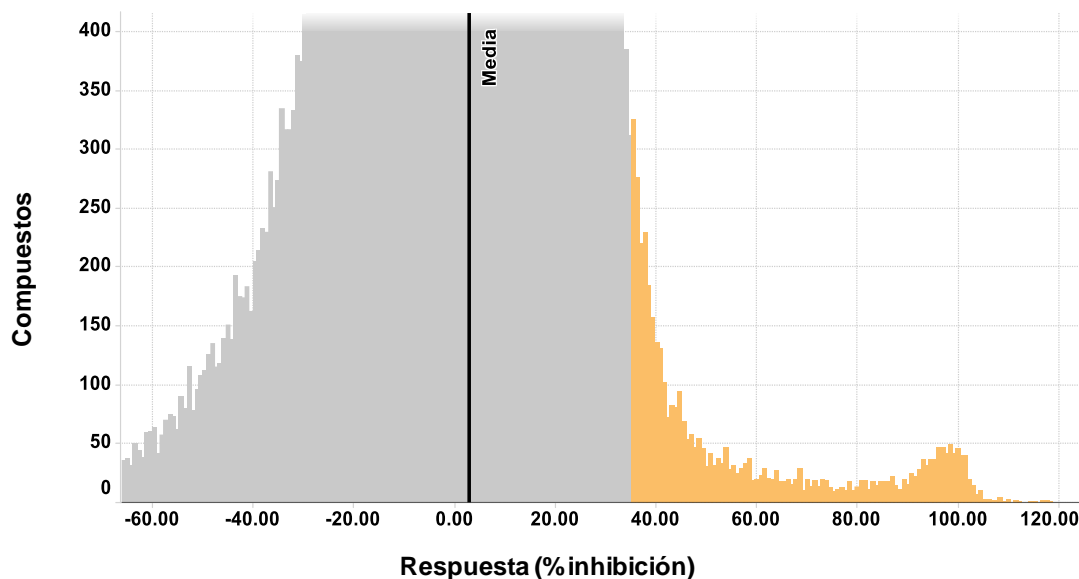


Figura 36. Selección de *hits* del ensayo primario frente a *L. donovani*.

El histograma representa el número de compuestos en función de los valores de % de inhibición. Los compuestos seleccionados en base al *cut-off* estadístico del 35% de inhibición se representan en color amarillo.

A continuación, la Figura 37 muestra la cascada de progresión en la que se recogen los ensayos, los criterios de selección y los resultados obtenidos durante esta fase del *screening* frente a *L. donovani*, que permitieron la progresión de parte de los compuestos a la siguiente fase del proceso.

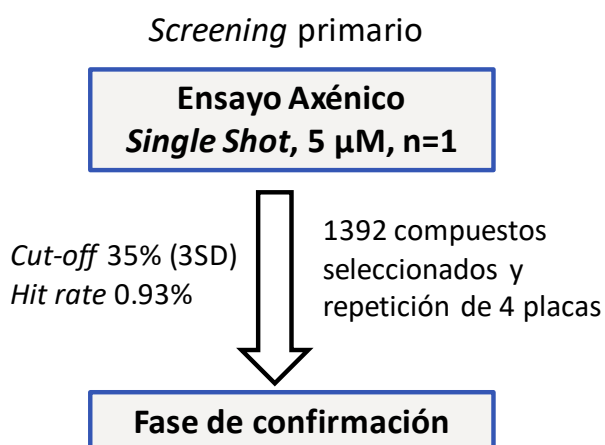


Figura 37. Cascada de progresión de los compuestos del *screening* primario a la fase de confirmación frente a *L. donovani*.

#### 4.1.2. RESULTADOS DE *SCREENING* PRIMARIO FRENTE A *TRYPANOSOMA CRUZI*

El cribado primario de los compuestos frente a *T. cruzi* se realizó empleando el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa descrito previamente en la sección 3.4.1 de la presente Tesis Doctoral. Al igual que en el caso de la leishmaniasis, la forma parasitaria más relevante para la enfermedad de Chagas es el amastigote. Es importante tener en cuenta que los compuestos activos en el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa actúan frente a los amastigotes intracelulares en células NIH-3T3, aunque dado que la infección tiene lugar ya en presencia del compuesto, puede ocurrir que algunos actúen inhibiendo dicho proceso, a nivel de la interacción parásito-célula o que sean activos frente a los propios tripomastigotes (Peña et al. 2015).

En el caso de la búsqueda de fármacos frente a *T. cruzi*, es importante tener en cuenta la diversidad genética de esta especie y seleccionar la cepa a utilizar en el proceso. Para ello, un grupo de expertos consensuó durante el *Chagas Clinical Research Platform Meeting* en 2012, los criterios para la selección de cepas de *T. cruzi* para el *screening* de fármacos (Zingales et al. 2014). Según dicho consenso, las actividades de HTS pueden limitarse a una única cepa, si bien, recomiendan priorizar aquellas pertenecientes a DTUs que frecuentemente se asocian a infecciones en el ser humano (TcI, TcII, TcV y TcVI). Sugieren que, una vez identificado un candidato prometedor, debe ser estudiado frente a un panel de cepas (una o dos representantes de cada DTU), de nuevo priorizando aquellas asociadas a las infecciones en el ser humano, procurando seleccionar cepas de diferente distribución geográfica y con distinta susceptibilidad a benznidazol y nifurtimox, especialmente si el candidato en estudio es análogo de estos últimos (Zingales et al. 2014).

En estudios basados en la determinación de  $IC_{50}$  en ensayos de amastigotes intracelulares frente a distintas cepas de *T. cruzi* se ha observado que la cepa Tulahuen (DTU TcVI) presenta una mayor sensibilidad a fármacos con distinto modo de acción (nitroheterocíclicos, azoles, oxaborol...) en comparación con cepas representantes de otras DTUs. En el estudio realizado por Moraes et al. se observó que aquellas cepas de crecimiento más rápido y mayor infectividad presentan menor sensibilidad a fármacos (Moraes et al. 2014).

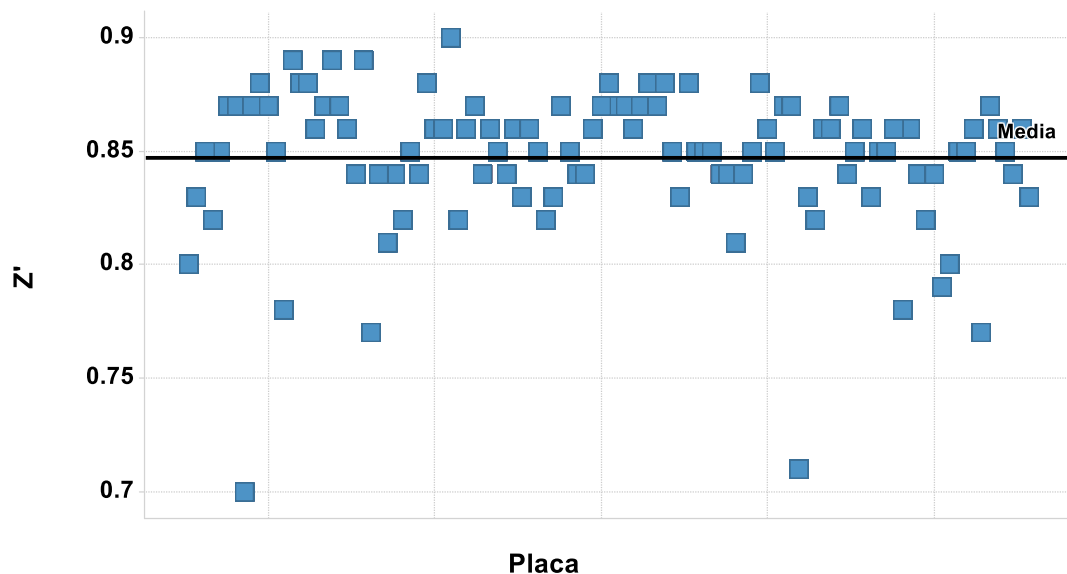
Entre las recomendaciones de los expertos encontramos también la posibilidad de usar organismos genéticamente modificados para facilitar las tareas de *screening*, siempre y cuando dicha modificación genética no se traduzca en grandes cambios fenotípicos con respecto a la cepa de referencia. En este último caso se encuadra la cepa Tulahuen, utilizada en este *screening*

entre otros muchos, perteneciente a la DTU TcVI, expresando  $\beta$ -galactosidasa (Buckner et al. 1996, Zingales et al. 2014, Vega et al. 2005, Chatelain and Ioset 2018, Neitz et al. 2015).

La utilización de parásitos modificados genéticamente para la expresión de esta enzima permite la evaluación de un gran número de compuestos en poco tiempo, además, en comparación con los ensayos colorimétricos, este ensayo basado en la medida de fluorescencia presenta mayor sensibilidad y especificidad, y disminuye las interferencias debidas a compuestos coloreados que absorban a la misma longitud de onda que se pretende detectar. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el ensayo fluorimétrico no está exento de desventajas, ya que los compuestos que bloquean la fluorescencia pueden resultar en la identificación de falsos positivos. Al tratarse de una medida indirecta, mediada por la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa, puede darse el caso de que existan compuestos falsos positivos por inhibir dicha enzima (Buckner et al. 1996, Chatelain and Ioset 2018).

Además, al tratarse de un ensayo celular en el que se evalúa la actividad sobre amastigotes intracelulares, los compuestos tóxicos frente a las células hospedadoras también serán considerados como falsos positivos. Estas limitaciones son minimizadas mediante el empleo de otro tipo de ensayos en fases posteriores para la confirmación de la actividad de los compuestos seleccionados en el *screening* primario.

Durante este cribado primario el valor medio de  $Z'$  de las placas de ensayo aceptadas como válidas tras el control de calidad fue de  $0.85 \pm 0.03$ . Como se muestra en la Figura 38, las 107 placas ensayadas obtuvieron valores de  $Z' > 0.4$ . Las dos placas restantes no pudieron ser ensayadas al resultar dañadas durante el transporte entre las instalaciones de Calibr y GSK, y fueron repetidas en fase de confirmación.



**Figura 38. Distribución de valores de  $Z'$  de las placas ensayadas en el *screening* primario frente a *T. cruzi*.**

Entre los compuestos estándares ensayados para el control de calidad farmacológico se encuentran los compuestos benznidazol, nifurtimox y posaconazol, para los que se obtuvieron valores de  $pIC_{50}$  en este ensayo de  $5.59 \pm 0.09$ ,  $6.03 \pm 0.08$  y  $8.43 \pm 0.10$ , respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados en la literatura (Buckner et al. 1996, Annang et al. 2015, Peña et al. 2015), por tanto, el ensayo queda validado a nivel farmacológico.

Aplicando el criterio general de la media + 3SD para el establecimiento del *cut-off*, el *hit rate* sería del 4.33% (6490 compuestos por encima del 14.75% de inhibición), resultando inviable en cuanto a la logística en la fase de confirmación. Por este motivo, como se muestra en la Figura 39, se consideró finalmente un *cut-off* de 6 veces la desviación estándar de las muestras (45% de inhibición), seleccionando 3013 compuestos para ser progresados a fase de confirmación (*hit rate* del 2%).

Dado que la capacidad de evaluación de compuestos en fase de confirmación era superior al número de compuestos seleccionados con dicho criterio, se decidió incrementar el número a evaluar en esta fase mediante la inclusión compuestos que aumentaban la diversidad química respecto a los seleccionados previamente. En total, 3598 compuestos fueron progresados a la fase de confirmación (Figura 40).

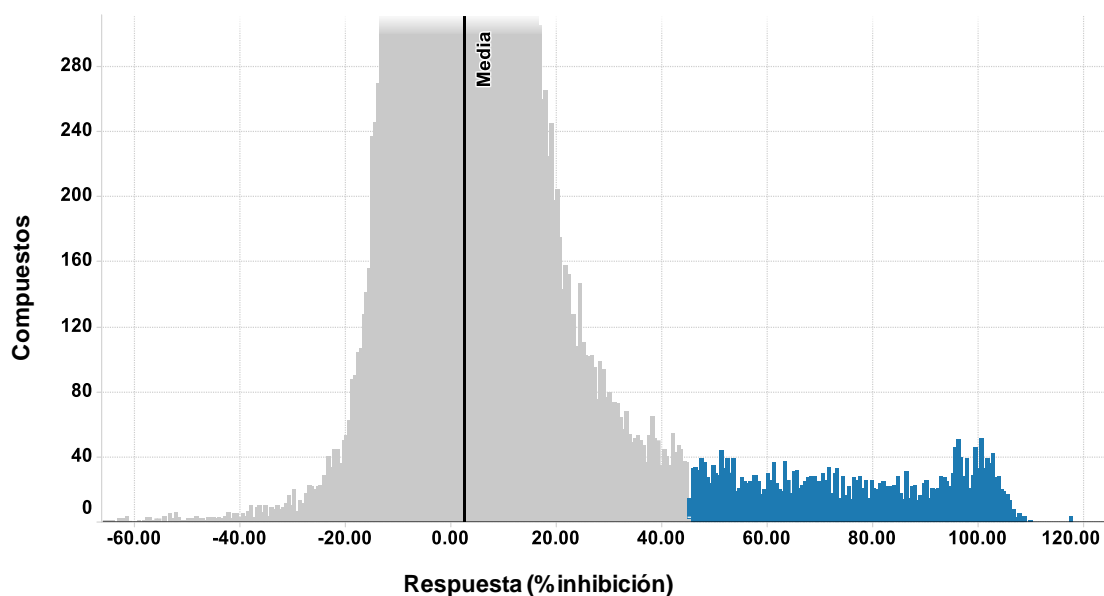


Figura 39. Selección de *hits* del ensayo primario frente a *T. cruzi*.  
En color azul los compuestos seleccionados en base al *cut-off* (6SD).

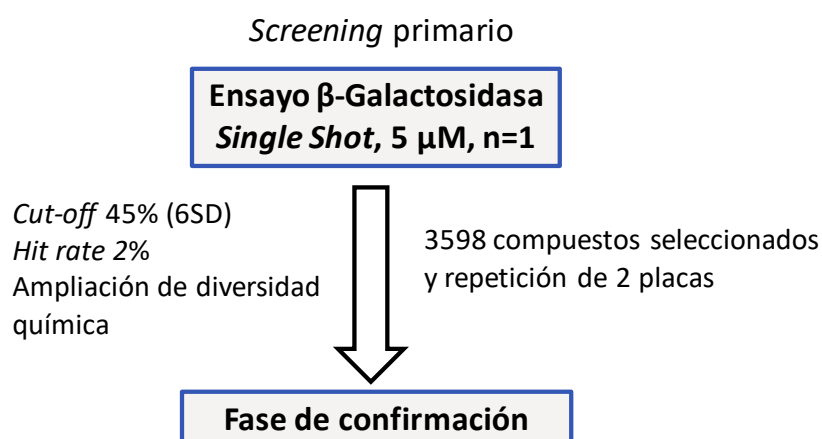


Figura 40. Cascada de progresión de los compuestos del *screening* primario a la fase de confirmación frente a *T. cruzi*.

Como ya se ha comentado, una de las desventajas de este ensayo es la inclusión de falsos positivos de diferente origen, lo que hace esperable un *hit rate* alto (Peña et al. 2015, Chatelain and Ioset 2018). Será necesaria la confirmación posterior testando los compuestos activos en un ensayo basado en una tecnología diferente, para descartar los falsos positivos por interferencia con el sistema de detección, así como en un ensayo que permita descartar los compuestos tóxicos.

## 4.2. FASE DE CONFIRMACIÓN

Durante la fase de confirmación se ensayaron de nuevo los compuestos seleccionados frente a cada parásito a una concentración final de 5  $\mu\text{M}$  y, en este caso, por duplicado. Como medidas de control de calidad se utilizó el parámetro  $Z'$  y el comportamiento de los compuestos estándares incluidos en cada experimento.

### 4.2.1. RESULTADOS DE LA FASE DE CONFIRMACIÓN FRENTE A *LEISHMANIA DONOVANI*

Para la fase de confirmación de los *hits* de *L. donovani* se llevaron a cabo por duplicado el ensayo axénico, utilizado en el *screening* primario, e InMac, descritos previamente en la sección 3.3 de esta Tesis Doctoral. El valor medio de  $Z'$  para los diferentes ensayos se recoge en la Tabla 15.

**Tabla 15. Valores de  $Z'$  media para los diferentes ensayos y *outputs* frente a *L. donovani* en fase de confirmación.**

Ensayo	$Z'$ (media $\pm$ SD)
Axénico	0.62 $\pm$ 0.05
InMac AmMac	0.68 $\pm$ 0.11
InMac InfCel	0.87 $\pm$ 0.02

Entre los compuestos estándares ensayados para el control de calidad farmacológico se encuentran los compuestos anfotericina B y miltefosina, para los que se obtuvieron valores de  $\text{pIC}_{50}$  en el ensayo axénico de 5.5 y 5.0, respectivamente. En el caso del ensayo InMac, los valores de  $\text{pIC}_{50}$  en el parámetro AmMac fueron de  $6.95 \pm 0.07$  para anfotericina B y de  $4.96 \pm 0.19$  para miltefosina. Estos resultados son similares a los reportados en la literatura para ensayos de amastigotes axénicos e intracelulares (De Rycker et al. 2013, Vermeersch et al. 2009, Seifert, Escobar, and Croft 2010).

Teniendo en cuenta las limitaciones del ensayo axénico discutidas anteriormente, los compuestos elegidos deben ser confirmados empleando un ensayo de amastigotes intracelulares (De Rycker et al. 2013). A la hora de desarrollar un ensayo intra-macrófago es importante tener en cuenta la célula hospedadora ya que la actividad de los diferentes compuestos es dependiente de la misma (Seifert, Escobar, and Croft 2010). Esta dependencia es mayor o menor en función del mecanismo de acción de los fármacos. Por ejemplo, compuestos que requieren de mecanismos celulares para ser activos, como el estibogluconato sódico, son muy dependientes de la célula hospedadora, mientras que otros compuestos, como la

anfotericina B, cuya acción no depende de mecanismos celulares, no se ven afectados por la variación de la misma. En general, las discrepancias observadas de actividad de los compuestos sobre amastigotes intracelulares en diferentes células hospedadoras son cuantitativas más que cualitativas, es decir, el empleo de una u otra célula suele traducirse en variaciones de potencia más que en observaciones de actividad/inactividad (Martín, Cantizani, and Peña 2018).

En línea con lo discutido anteriormente, el diseño de un ensayo debe hacerse de forma que sea biológicamente relevante en el contexto de la enfermedad. En este sentido, a la hora de seleccionar la célula hospedadora sería preferible el empleo de macrófagos primarios, idealmente de origen humano (Horvath et al. 2016). Sin embargo, esta elección dificulta enormemente la realización de tareas de *screening*, debido a la falta de homogeneidad entre muestras y la escasez de las mismas (Martín, Cantizani, and Peña 2018, De Rycker et al. 2013). Haciendo un balance de las ventajas y desventajas de los distintos tipos de células hospedadoras, se utilizaron monocitos THP-1 diferenciados con PMA, considerados como buen modelo celular de macrófagos humanos, asegurando la accesibilidad, reproducibilidad y estandarización del ensayo (Gebre-Hiwot et al. 1992).

Los compuestos seleccionados en el *screening* primario fueron confirmados tanto en el ensayo axénico como en el ensayo InMac. Sin embargo, las placas rechazadas en el *screening* primario se repitieron únicamente en el ensayo axénico por duplicado por una cuestión logística.

La repetición de placas supuso el ensayo axénico de 5632 compuestos, que considerando un *cut-off* estadístico del 35% resultó en la selección de 141 compuestos para progresar a la fase de dosis respuesta (2.5% de *hit rate*) (Figura 41). Ante la llamativa diferencia de *hit rate* entre estas repeticiones y el *screening* primario, se realizó una investigación del contenido en estructuras químicas de las placas de repeticiones, con la hipótesis de que una baja diversidad química puede traducirse en valores de *hit rate* inusuales. En este caso, se demostró que las placas de las repeticiones estaban enriquecidas especialmente en oxadiazoles y en potenciales inhibidores de kinasas, sumando entre ambos más del 50% de los compuestos ensayados, lo que explica el elevado *hit rate* (Merritt et al. 2014, Pitasse-Santos, Sueth-Santiago, and Lima 2017).

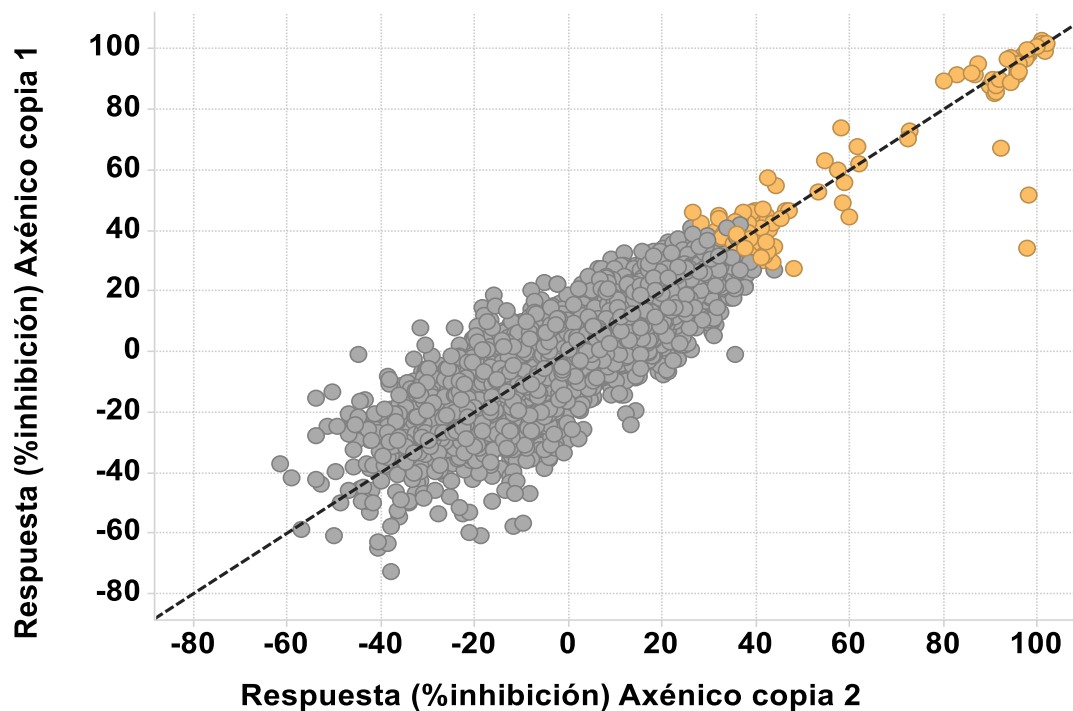


Figura 41. Correlación entre las dos copias de los compuestos repetidos en el ensayo axénico y selección de compuestos a progresar a la fase de dosis respuesta (amarillo).

Por otro lado, en la confirmación del ensayo axénico se ensayaron 1392 compuestos por duplicado, como se muestra en la Figura 42. Se estableció un *cut-off* del 33% de inhibición, resultante de la aplicación del criterio de selección de hits explicado en la sección 3.5.2 de la presente Tesis Doctoral (media + 3SD).

Como se muestra en la Figura 43 en la página siguiente, la tasa de confirmación de este ensayo respecto al *screening* primario es del 40%. Al establecer un *cut-off* bajo, es frecuente encontrar en fases posteriores tasas de confirmación bajas. Sin embargo, si tenemos en cuenta aquellos compuestos con inhibición superior al 80% en el *screening* primario, se observa una tasa de confirmación del 65%.

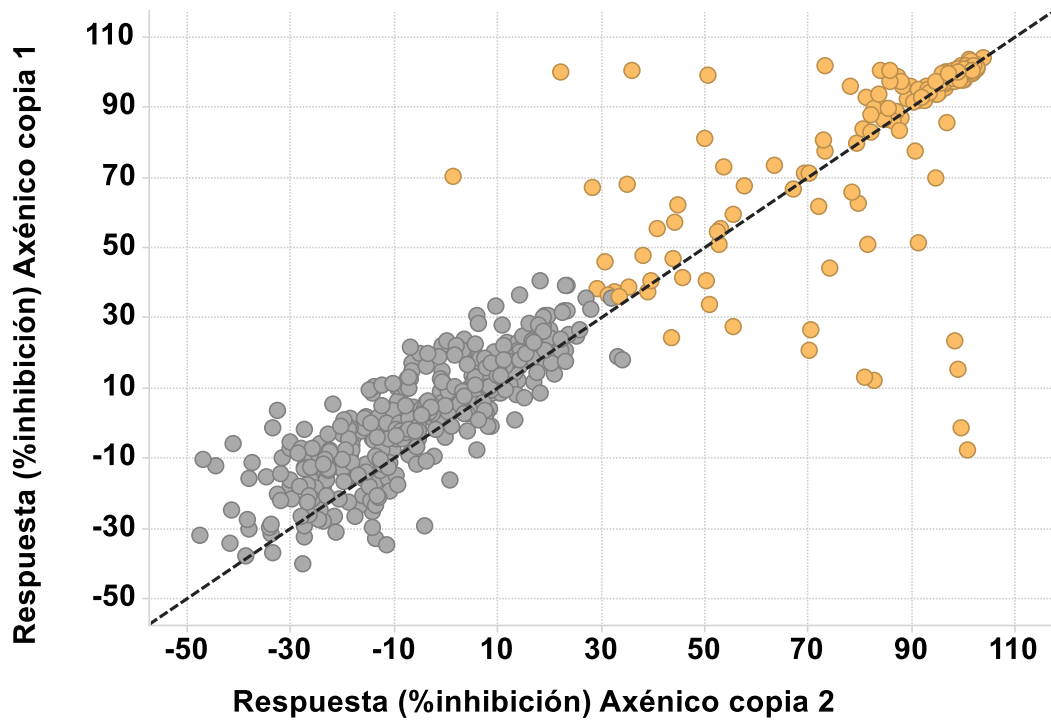


Figura 42. Correlación entre las dos copias en el ensayo axénico en fase de confirmación. Los compuestos marcados en amarillo son aquellos con inhibición superior al *cut-off*.

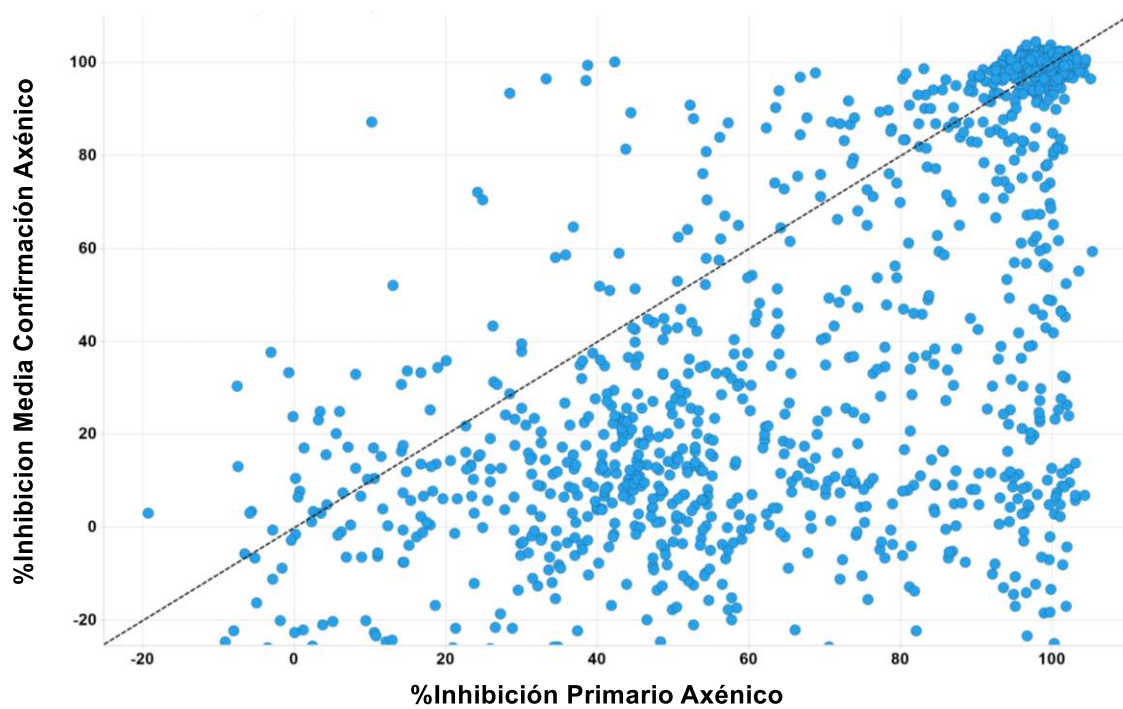
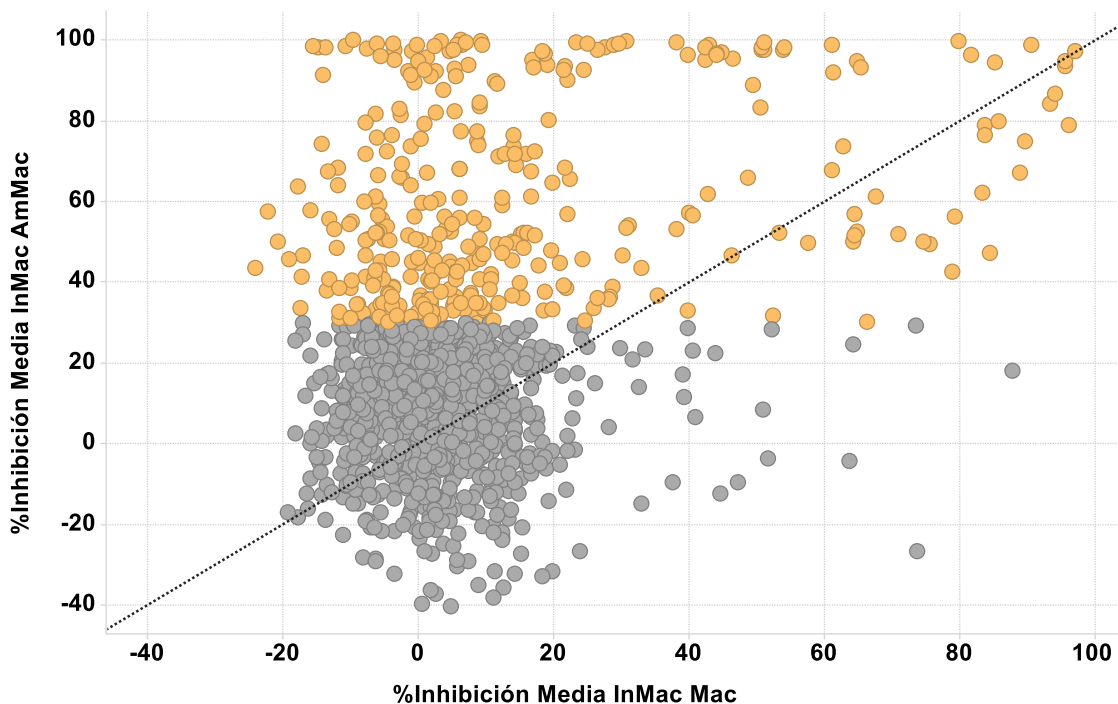


Figura 43. Correlación de los resultados obtenidos para el ensayo axénico en las fases de screening primario y confirmación.

A partir de los 1392 compuestos ensayados en InMac se seleccionaron 355 hits para progresar a dosis respuesta en base a su porcentaje de inhibición en el parámetro AmMac del ensayo InMac. Se estableció un *cut-off* de 30% empleando el criterio de media + 3SD descrito anteriormente (Figura 44). Con estos datos podemos determinar que la tasa de confirmación entre el ensayo primario axénico y el ensayo InMac AmMac es del 25%, en línea con la obtenida en otras campañas de *screening* similares descritas en la literatura (Martín, Cantizani, and Peña 2018).

La baja tasa de confirmación entre axénico y AmMac es razonable si tenemos en cuenta que en el segundo caso el compuesto debe actuar sobre amastigotes intracelulares, atravesando diversas membranas permeables y gradientes de pH. Además, en las membranas se encuentran transportadores activos y bombas de exclusión, que, junto con las variaciones de pH y la consiguiente ionización de ciertos compuestos, tienen una tremenda influencia en la actividad observada frente a amastigotes intracelulares (Figura 34). Otra de las diferencias entre ambos ensayos que puede explicar la baja tasa de confirmación es la alta tasa de replicación de los amastigotes axénicos en comparación con su lento crecimiento intracelular en el ensayo InMac. En el ensayo axénico, los compuestos estáticos y cidas son seleccionados como activos, sin poder diferenciarlos; sin embargo, en el ensayo InMac, en el que los parásitos tienen tasas de replicación muy bajas, pueden distinguirse y seleccionarse únicamente los compuestos cidas (Martín, Cantizani, and Peña 2018).

Teniendo en cuenta que, en general, se observó poca toxicidad de los compuestos ensayados frente a macrófagos (parámetro Mac del ensayo InMac) se decidió no descartar compuestos en base a su toxicidad en esta fase de la cascada de progresión, ya que podrían presentar una ventana terapéutica suficiente que se evaluaría en la fase de dosis respuesta (Figura 44).



**Figura 44. Selección de compuestos a progresar a la fase de dosis respuesta (amarillo) a partir de los resultados del ensayo InMac.**

**Representación del parámetro de eficacia AmMac frente al parámetro de toxicidad Mac.**

Sin embargo, se decidió filtrar en base a la estructura química, descartando los compuestos nitroaromáticos, por su alta reactividad, asociada a toxicidad idiosincrática; los benzodioxolanos, por su conocida hepatotoxicidad; y las aminotiazol piridinas, por presentar problemas de genotoxicidad (Smith 2011). La aplicación de este filtro por estructuras asociadas a toxicidad resultó en la progresión de 297 compuestos a la fase de dosis respuesta.

Además, en el estudio de las estructuras se identificaron 8 compuestos de especial interés al presentar estructuras novedosas, por lo que se incluyeron en fase de dosis respuesta todos los análogos disponibles en Calibr de las mismas. De este modo se incluyeron en la selección 297 compuestos progresados a partir del resultado en el ensayo InMac, 141 procedentes de las repeticiones del ensayo axénico y 122 análogos de los 8 compuestos identificados como novedosos. Por lo tanto, 560 compuestos fueron solicitados para los ensayos en dosis respuesta (Figura 45).

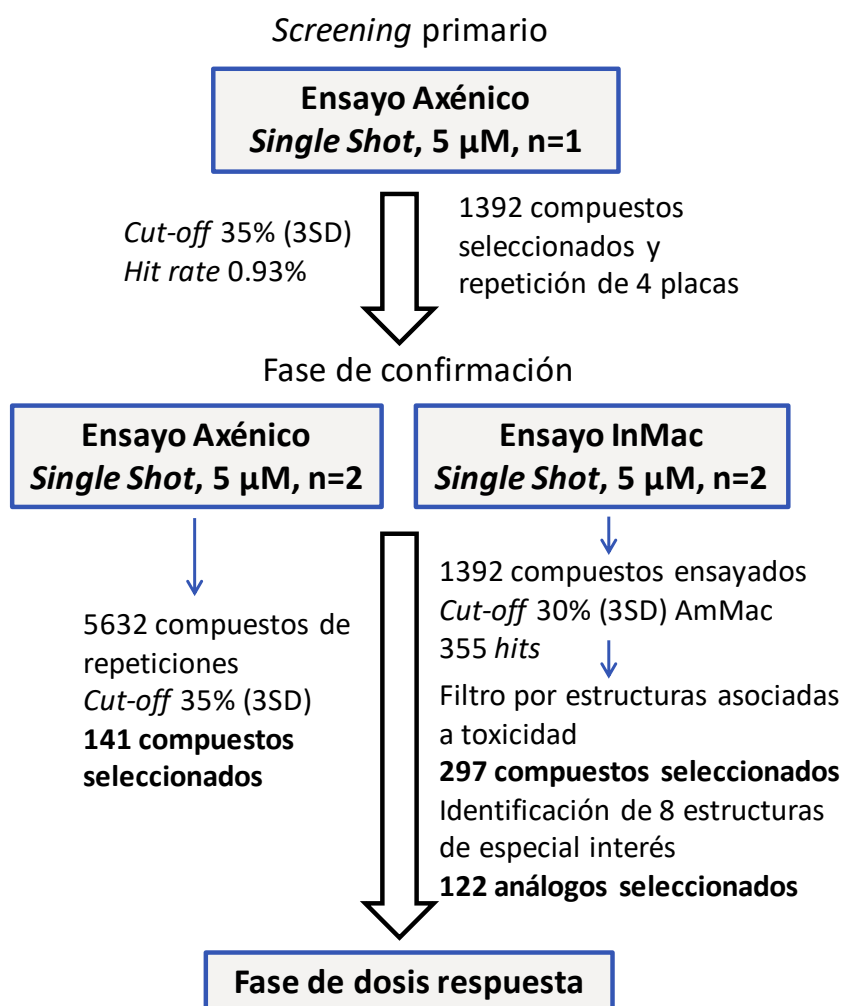


Figura 45. Cascada de progresión de los compuestos de la fase de confirmación a la fase de dosis respuesta frente a *L. donovani*.

#### 4.2.2. RESULTADOS DE LA FASE DE CONFIRMACIÓN FRENTE A *TRYPANOSOMA CRUZI*

Para la fase de confirmación de los hits de *T. cruzi* se llevaron a cabo por duplicado los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa, tripomastigotes a 72 h de incubación e *Imaging* descritos previamente en la sección 3.4 de la presente Tesis. El valor medio de  $Z'$  para los diferentes ensayos se recoge en la Tabla 16.

**Tabla 16. Valores de  $Z'$  media para los diferentes ensayos y *outputs* frente a *T. cruzi* en fase de confirmación.**

Ensayo	$Z'$ (media $\pm$ SD)
$\beta$ -galactosidasa	0.57 $\pm$ 0.05
Tripomastigotes	0.81 $\pm$ 0.03
Imaging AmCel	0.69 $\pm$ 0.06
Imaging InfCel	0.72 $\pm$ 0.04

Entre los compuestos estándares ensayados para el control de calidad farmacológico se encuentran benznidazol, nifurtimox y posaconazol, para los que se obtuvieron valores de  $pIC_{50}$  en el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa de 6.08, 6.69 y 8.61, respectivamente. En el caso del ensayo de tripomastigotes los valores de  $pIC_{50}$  obtenidos fueron de 5.34 para benznidazol y 6.1 para nifurtimox, mientras que el posaconazol fue inactivo en este ensayo. En el ensayo de *Imaging* los valores de  $pIC_{50}$  para el parámetro AmCel fueron de 5.77 para benznidazol, 6.44 para nifurtimox y 9.09 para posaconazol. Estos resultados son similares a los reportados en la literatura (Alonso-Padilla et al. 2015, Peña et al. 2015, MacLean 2018, Buckner et al. 1996, Annang et al. 2015, De Rycker et al. 2016).

Al igual que ocurre en el caso de *L. donovani*, el ensayo de *Imaging* frente a *T. cruzi* permite evaluar los compuestos que actúan sobre amastigotes intracelulares, así como su toxicidad en células de mamífero. De este modo, el empleo de este ensayo permite confirmar la actividad de los compuestos identificados en el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa y descartar falsos positivos por interferencia con el sistema de detección y compuestos tóxicos.

Durante el desarrollo de este ensayo (Alonso-Padilla et al. 2015), un aspecto fundamental fue la elección de la célula hospedadora. La selección de la línea celular de cardiomiocitos, H9c2, permitió la obtención de infecciones homogéneas, en las que la tasa de células infectadas y no infectadas era similar en todas las áreas del pocillo. Además, se trata de células fácilmente cultivables y que proporcionan resultados altamente reproducibles, sin embargo, como

desventaja podemos citar su gran tamaño, y, por tanto, la mayor dificultad que presentan a la hora de obtener grandes cantidades para *screening* en comparación con otras líneas celulares de menor tamaño. Otra de las ventajas asociadas al uso de la línea H9c2 es la relevancia de las células cardiacas en la enfermedad, ya que la patología causada por este parásito se relaciona frecuentemente con su presencia a nivel cardiaco (Alonso-Padilla et al. 2015). Recientemente, otros autores han manifestado que esta ventaja es secundaria respecto a las de índole práctica, ya que *T. cruzi* puede infectar múltiples tipos de células que podrían ser igualmente empleadas en cultivo *in vitro* (Chatelain and Ioset 2018).

Aunque la necesidad de que los compuestos sean activos frente a todas las formas parasitarias de *T. cruzi* está sujeta a debate, existe un consenso general que indica que la forma parasitaria a priorizar es el amastigote intracelular. Sin embargo, el hecho de que los azoles, que fallaron en clínica, sean inactivos frente a los tripomastigotes, plantea la necesidad de que los compuestos actúen también frente a esta forma-parasitaria no replicativa (Chatelain and Ioset 2018). En este contexto, el ensayo de tripomastigotes permite discernir aquellos compuestos activos frente a esta forma parasitaria y aquellos inactivos, con perfil similar a los fallidos azoles.

Además, los inhibidores de CYP51, como el posaconazol, no son capaces de eliminar la infección producida por *T. cruzi*, al contrario que los compuestos benznidazol y nifurtimox, que sí que presentan un comportamiento cida frente al parásito (Moraes et al. 2014, Chatelain and Ioset 2018). Por este motivo, los compuestos que presentan como modo de acción la inhibición de esta enzima deben perder prioridad en la cascada de progresión de *screening* lo antes posible (Chatelain and Ioset 2018). Siguiendo este razonamiento, se han buscado ensayos que permitan diferenciar el comportamiento de benznidazol y nifurtimox del comportamiento de posaconazol, como el ensayo de tripomastigotes empleado en este *screening* (MacLean 2018). En definitiva, este ensayo permite diferenciar compuestos cuya actividad sea dependiente de la replicación del parásito, estáticos, de compuestos cidas.

Teniendo todo esto en cuenta, los compuestos seleccionados en el *screening* primario fueron confirmados en el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa, utilizado en el ensayo primario, así como en los ensayos de *Imaging* y tripomastigotes a 72 horas de incubación. Sin embargo, las placas que no pudieron ser ensayadas en el *screening* primario se repitieron únicamente en el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa por duplicado por una cuestión logística.

La repetición de placas supuso el ensayo de 937 compuestos (Figura 46), que considerando un *cut-off* estadístico del 33% resultó en la selección de 33 compuestos para progresar a la fase de dosis respuesta (3.5% de *hit rate*).

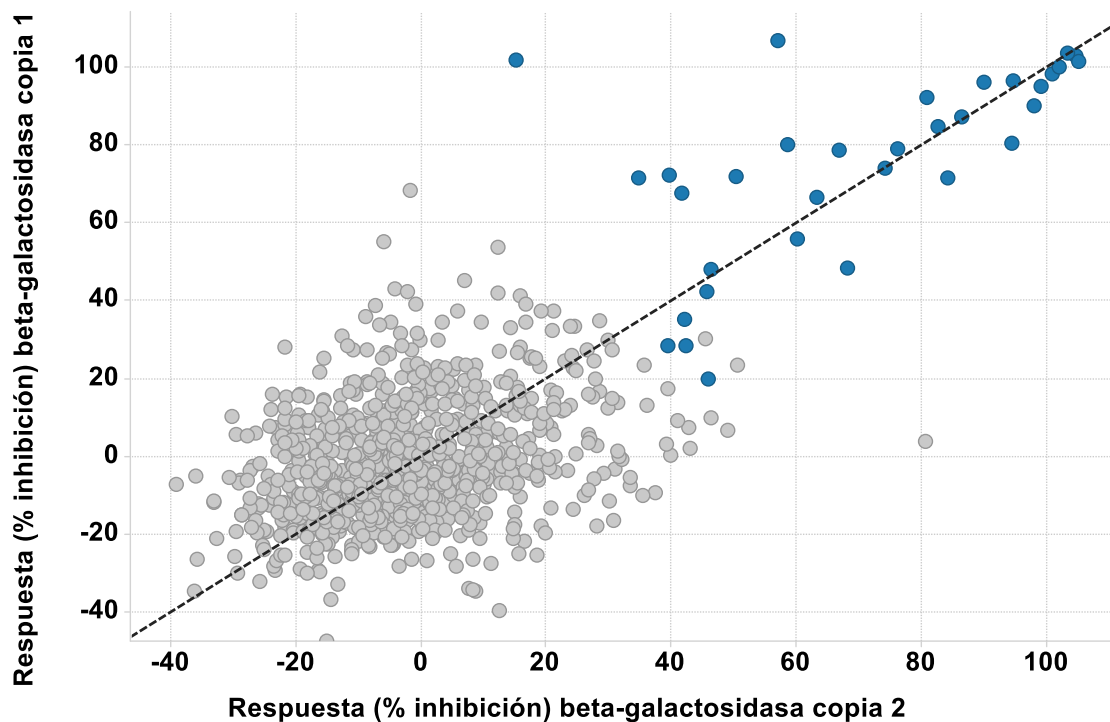


Figura 46. Correlación entre las dos copias de los compuestos repetidos en el ensayo  $\beta$ -galactosidasa y selección de compuestos a progresar a la fase de dosis respuesta (azul).

Los 3598 compuestos seleccionados en el *screening* primario fueron ensayados por duplicado en los tres ensayos. Los *cut-off* a 3SD de los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa, *Imaging* AmCel y tripomastigotes fueron 33%, 29% y 18%, respectivamente. La tasa de confirmación del ensayo de  $\beta$ -galactosidasa fue del 88%.

A la hora de comparar los resultados para los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa y de *Imaging* se observó una clara falta de correlación para parte de los compuestos, que ya ha sido previamente reportada por otros autores (Yang et al. 2017). Los factores que tienen una mayor influencia en la diferencia de sensibilidad a los compuestos en estos ensayos son: el tiempo de incubación (96 horas para el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa y 72 horas para el ensayo de *Imaging*) y el protocolo de infección de las células y dispensación de los compuestos (Yang et al. 2017). Como se muestra en la Figura 47, existen dos zonas, identificadas como A y B en la imagen, que muestran compuestos activos únicamente en uno de los dos ensayos.

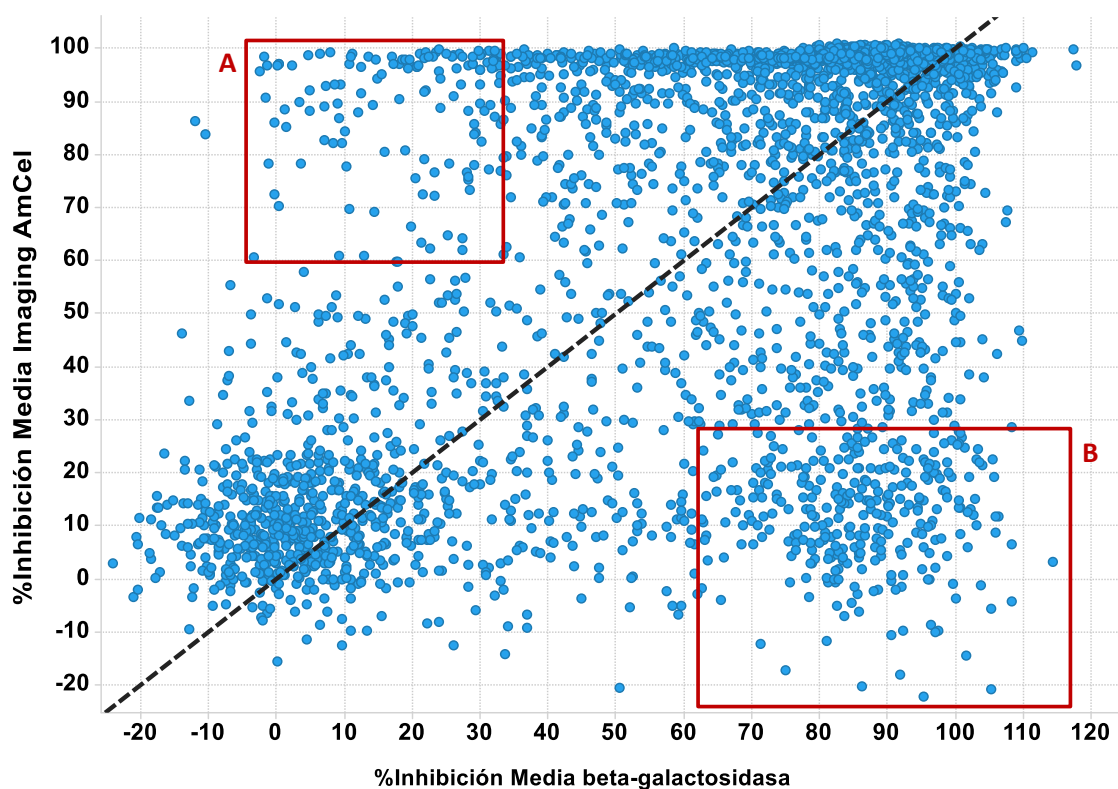


Figura 47. Correlación entre los ensayos de *Imaging AmCel* y  $\beta$ -galactosidasa.

La zona A, que representa compuestos activos en AmCel e inactivos en el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa, se corresponde con el 12% de compuestos que no han confirmado su actividad en el ensayo que se empleó como cribado primario.

Por otro lado, la zona B se corresponde con los falsos positivos del ensayo de  $\beta$ -galactosidasa, que, como ya se ha comentado, pueden deberse tanto a interferencias con el sistema de detección (inhibición de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, bloqueo de la señal de fluorescencia por los compuestos) o a toxicidad frente a las células 3T3 empleadas en dicho ensayo. Hay que tener en cuenta que las células que emplea el ensayo de *Imaging* son diferentes y por lo tanto pueden ser compuestos tóxicos para 3T3 y no para H9c2.

Además, puede existir un sesgo por modo de acción en la selección de activos en ambos ensayos. A modo de ejemplo, el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa es más sensible a compuestos inhibidores de la síntesis de ergosterol en comparación con el ensayo de *Imaging*. Teniendo en cuenta que los parásitos poseen reservas de ergosterol, en presencia de un inhibidor de la síntesis del mismo, es necesario que tengan lugar varias divisiones celulares para que dichas reservas disminuyan y pueda observarse el efecto inhibitor del crecimiento causado por la presencia del inhibidor de la síntesis del ergosterol. Por este motivo, la duración más larga de la incubación en presencia de los compuestos en el ensayo fluorimétrico hace que los compuestos que actúan por este

mecanismo de acción sean más potentes que en el ensayo de *Imaging*, de menor duración (Neitz et al. 2015).

Teniendo en cuenta los resultados observados en los tres ensayos se decidió seleccionar en base a los resultados del ensayo de tripomastigotes, incluyendo por tanto todos los compuestos con alta probabilidad de ser cidas, independientemente de su actividad en el ensayo de *Imaging* (Figura 48). Dado que en general los valores de toxicidad frente a H9c2 fueron bajos, se decidió no filtrar por toxicidad en esta fase, ya que los compuestos podrían presentar ventana terapéutica suficiente que se evaluaría en la fase de dosis respuesta (Figura 49).

Con esta selección y añadiendo los 33 compuestos progresados de las placas de repetición, un total de 1337 compuestos fueron elegidos a partir de los resultados de los ensayos frente a *T. cruzi* en fase de confirmación. Pero teniendo en cuenta el limitado número de compuestos que se pueden ensayar en dosis respuesta, se decidió filtrar esta lista de compuestos en base a su estructura y propiedades fisicoquímicas recurriendo a expertas en esta área y empleando los programas informáticos especificados en la sección 3.5.2 de esta Tesis. Tras un *clustering* inicial por estructuras químicas, se limitó a 3 el número de compuestos por familia priorizando en función de las siguientes propiedades calculadas: lipofilia, solubilidad, estructuras sustrato de bombas de exclusión y volumen de distribución. Los compuestos nitroaromáticos y PAINS fueron descartados (Smith 2011, Baell and Holloway 2010).

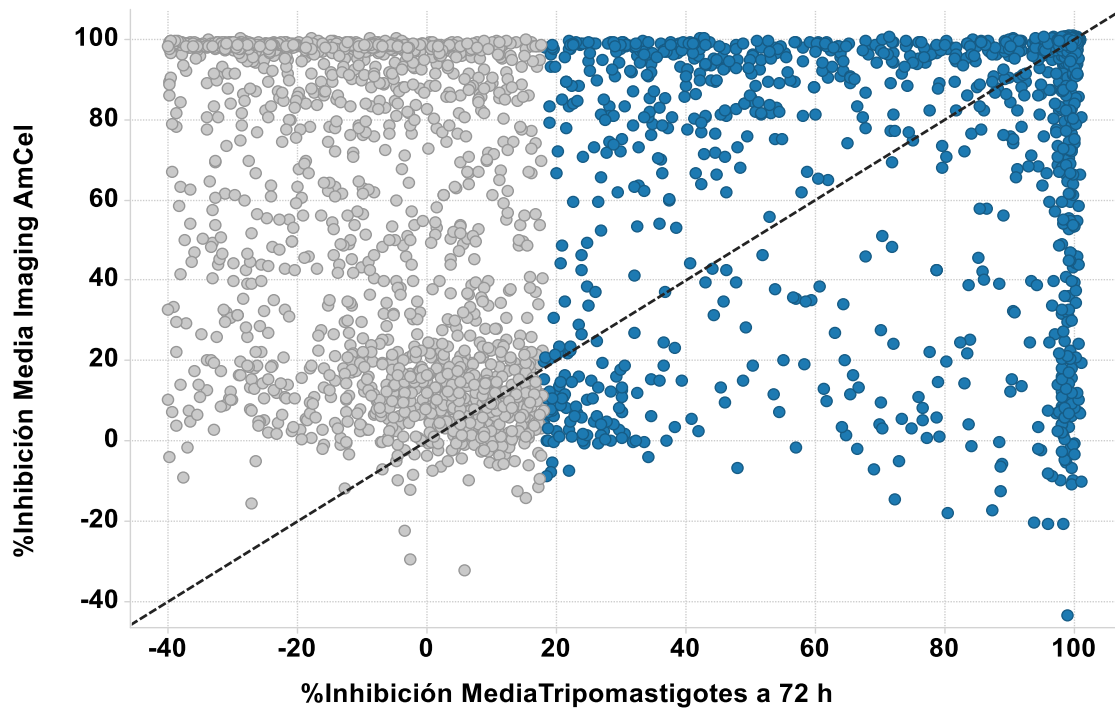


Figura 48. Selección de compuestos a progresar a la fase de dosis respuesta (azul) a partir de los resultados del ensayo de tripomastigotes a 72 h.

Representación del parámetro de eficacia AmCel del ensayo de Imaging frente a los resultados del ensayo de tripomastigotes a 72 h.

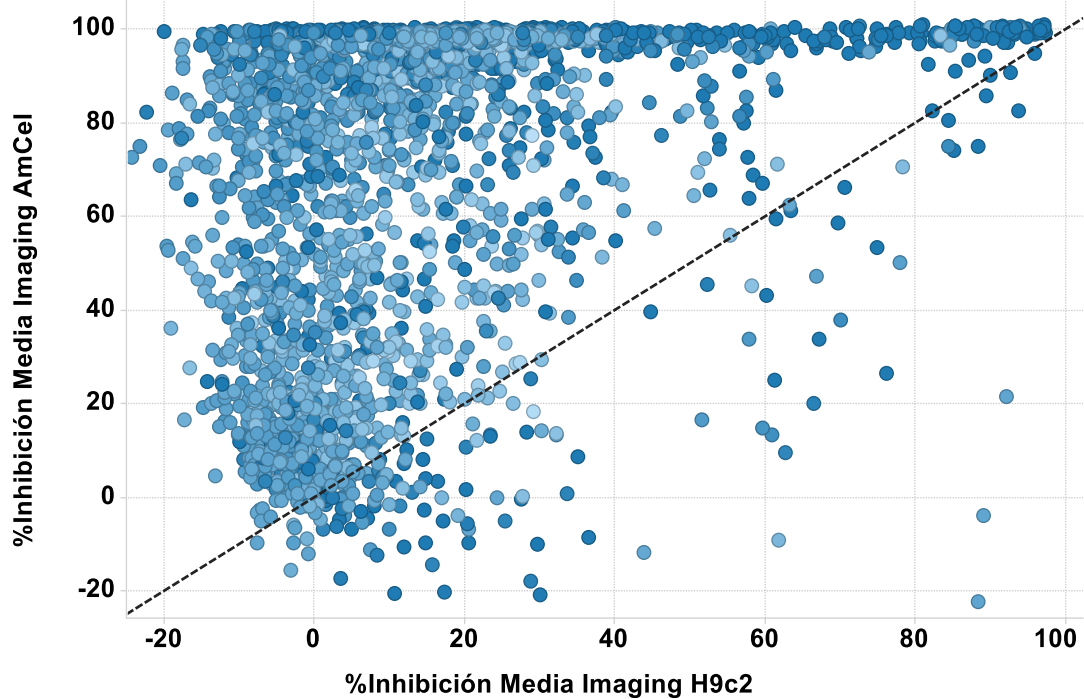


Figura 49. Correlación entre los parámetros AmCel (eficacia) y H9c2 (toxicidad) en el ensayo de *Imaging* en la fase de confirmación.

El gradiente de color corresponde al % de inhibición en el ensayo de tripomastigotes.

Finalmente, 900 compuestos fueron progresados a la fase de dosis respuesta: 778 procedentes de la confirmación y 122 análogos que fueron seleccionados a partir de la identificación de las 8 estructuras citadas anteriormente en el *screening* de *L. donovani* (Figura 50). La inclusión de los análogos de estas estructuras se realizó con la hipótesis de que estos 8 compuestos activos frente a *L. donovani* también podrían serlo frente a *T. cruzi*, como ocurre en muchos casos reportados en la literatura en los que se observa que diferentes estructuras químicas tienen actividad frente a los diferentes kinetoplastidos (Peña et al. 2015, Khare et al. 2016).

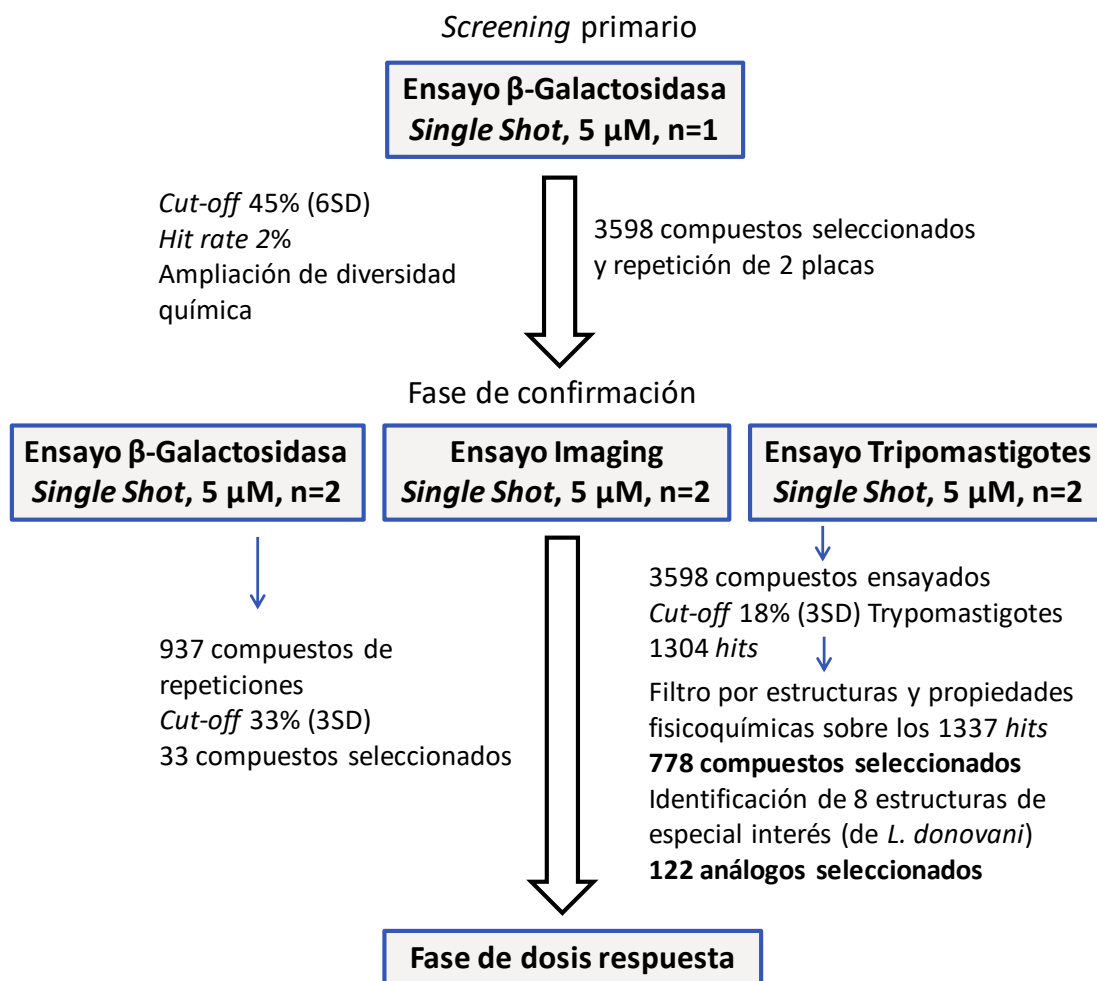


Figura 50. Cascada de progresión de los compuestos de la fase de confirmación a la fase de dosis respuesta frente a *T. cruzi*.

### 4.3. FASE DE DOSIS RESPUESTA

Durante la fase de dosis respuesta se ensayaron los compuestos seleccionados frente a cada parásito por duplicado empleando diluciones seriadas 1/3 con 11 concentraciones, teniendo el primer punto una concentración final en el ensayo de 50  $\mu\text{M}$ . Como medidas de control de calidad se utilizó el parámetro Z' y el comportamiento de los compuestos estándares incluidos en cada experimento.

En esta fase cobra especial importancia, no sólo la determinación de la eficacia, sino también la evaluación de la potencial toxicidad de los compuestos. Para ello, además de la determinación de la toxicidad sobre las células empleadas en los ensayos de imagen frente a ambos parásitos, se utilizó la línea celular de hepatoblastoma humano, HepG2, en un ensayo de citotoxicidad para todos los compuestos. En todos los casos, el valor de toxicidad obtenido para las diferentes líneas celulares (THP-1, H9c2, HepG2) se utilizó para el cálculo del SI (*Selectivity Index*) explicado en la sección 3.5.2 de esta Tesis, que representa la diferencia entre eficacia y toxicidad de un determinado compuesto, y que por tanto aporta información sobre la ventana terapéutica del potencial fármaco.

A la hora de determinar la toxicidad de xenobióticos, los hepatocitos primarios humanos se consideran el modelo celular de referencia, sin embargo, al igual que ocurre en otros ensayos, el uso de células primarias dificulta las tareas de *screening* por su baja accesibilidad y su heterogeneidad (Mersch-Sundermann et al. 2004, Castell et al. 2006).

El empleo de líneas celulares hepáticas que expresen de manera endógena las enzimas responsables del metabolismo de xenobióticos como modelo de toxicidad está ampliamente aceptado. De entre ellas, destaca la línea celular HepG2, aislada por primera vez en 1972 a partir de un hepatoblastoma. Estas células expresan multitud de enzimas de metabolismo de fase I y fase II (Mersch-Sundermann et al. 2004, Bettioli et al. 2009).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el nivel de expresión de estas enzimas en HepG2 es muy bajo en comparación con el observado en células hepáticas primarias, por lo que la predicción de la potencial toxicidad en humanos puede ser menos acertada. A pesar de ello, es la elección más ampliamente aceptada en estudios iniciales de toxicidad *in vitro* en el proceso de búsqueda de nuevos fármacos (Mersch-Sundermann et al. 2004, Qiu et al. 2015, Castell et al. 2006).

#### 4.3.1. RESULTADOS DE LA FASE DE DOSIS RESPUESTA FRENTE A *LEISHMANIA DONOVANI*

En la fase de dosis respuesta frente a *L. donovani* se realizaron los ensayos axénico e InMac y se incluyó el ensayo de HepG2, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3.4 de esta Tesis, para evaluar la toxicidad. El valor medio de Z' para los diferentes ensayos se recoge en la Tabla 17.

**Tabla 17. Valores de Z' media para los diferentes ensayos y outputs frente a *L. donovani* en fase de dosis respuesta.**

Ensayo	Z' (media ± SD)
Axénico	0.63 ± 0.08
InMac AmMac	0.66 ± 0.12
InMac InfCel	0.83 ± 0.05
HepG2	0.81 ± 0.04

Entre los compuestos estándares ensayados para el control de calidad farmacológico se encuentran los compuestos anfotericina B y miltefosina, para los que se obtuvieron valores de pIC<sub>50</sub> en el ensayo axénico de 5.70 ± 0.27 y 5.44 ± 0.17, respectivamente. En el caso del ensayo InMac, los valores de pIC<sub>50</sub> en el parámetro AmMac fueron de 6.73 ± 0.07 para anfotericina B y de 5.15 ± 0.14 para miltefosina. Estos resultados son similares a los reportados en la literatura para ensayos de amastigotes axénicos e intracelulares (De Rycker et al. 2013, Vermeersch et al. 2009, Seifert, Escobar, and Croft 2010). En el ensayo de HepG2 se emplearon como compuestos estándares digitoxina y doxorubicina, con valores de pIC<sub>50</sub> de 7.08 ± 0.05 y 5.91 ± 0.07, respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados en la literatura en ensayos similares de viabilidad de HepG2 (Xiao et al. 2017, Kan et al. 2014, Qiu et al. 2015).

Finalmente, por problemas con la disponibilidad de algunos compuestos, se ensayaron 404 compuestos junto con los 122 análogos de las estructuras previamente seleccionadas. Los resultados de los diferentes parámetros del ensayo InMac pueden observarse en la Figura 51. La potencia en Mac es generalmente baja, justificada por la política de Calibr por la que revisan periódicamente su colección de compuestos retirando de la misma aquellos con toxicidad conocida. La correlación entre los parámetros de eficacia AmMac e InfCel es buena, con un desplazamiento típico que muestra potencias ligeramente superiores en AmMac. Hay que tener en cuenta que mientras que el parámetro AmMac representa la cuantificación del número de amastigotes por macrófago (cantidad de infección), el parámetro InfCel es cualitativo,

representando el porcentaje de células infectadas (presencia o ausencia de amastigotes). De este modo, mediante este análisis, podemos seleccionar aquellos compuestos que no solo reducen la infección, sino que son capaces de eliminar la presencia del parásito.

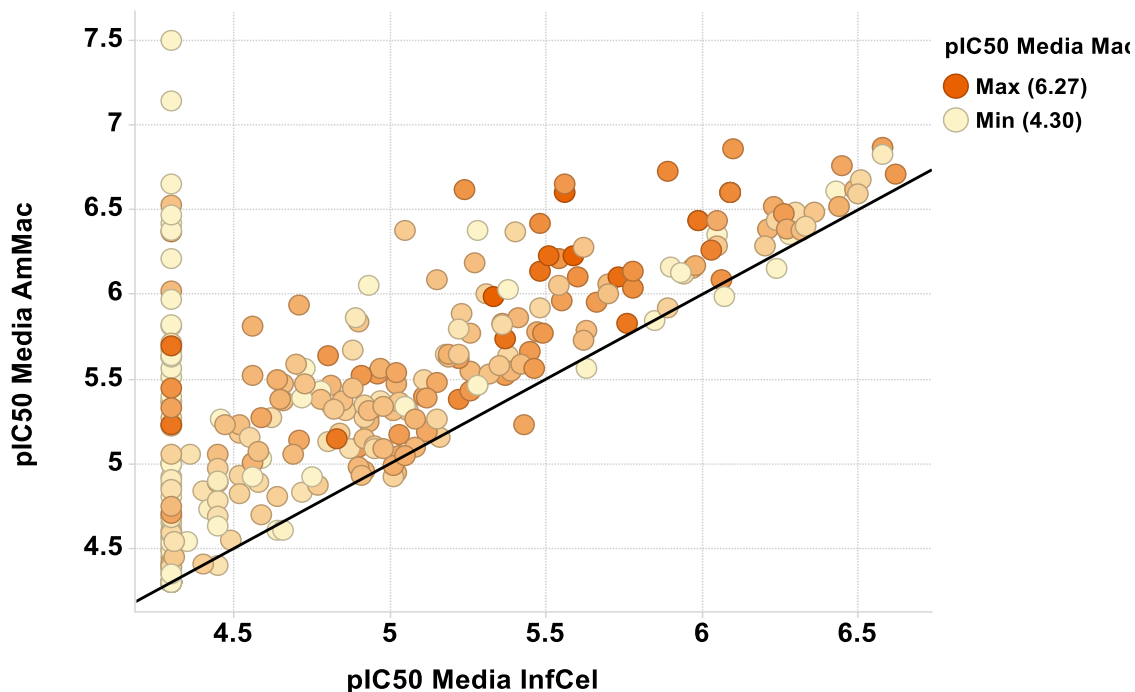


Figura 51. Representación de la correlación de los valores de  $pIC_{50}$  para cada compuesto en los parámetros AmMac e InfCel del ensayo InMac.

El gradiente de color corresponde con el valor de  $pIC_{50}$  para el parámetro Mac.

Al comparar los resultados obtenidos de toxicidad en macrófagos frente a la toxicidad en hepatocitos (Figura 52), observamos que en general hay buena correlación, aunque se manifiesta una mayor toxicidad en macrófagos. Hay que tener en cuenta que dichos macrófagos se encuentran infectados por *L. donovani* en mayor o menor medida, mientras que las células hepáticas en el ensayo de citotoxicidad no lo están.

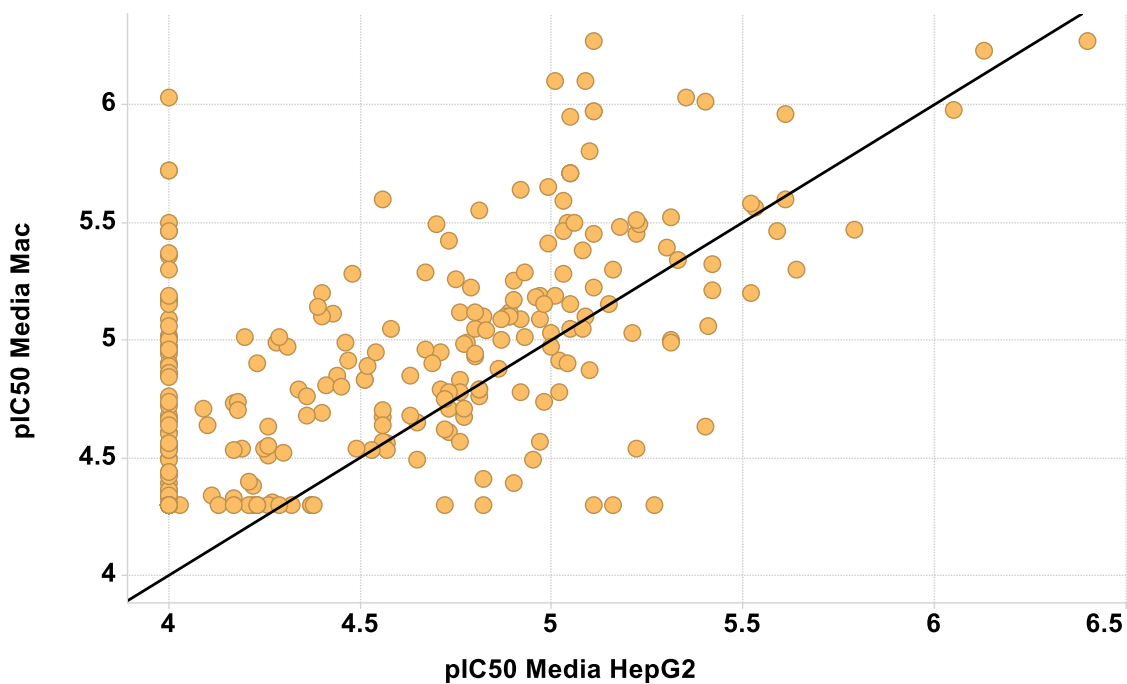


Figura 52. Representación de la correlación entre los dos valores de toxicidad: Mac y HepG2.

Finalmente, cinco familias y cuatro *singletons* (entidad química sin análogos estructurales) fueron seleccionados siguiendo los siguientes criterios:  $AmMac\ pIC_{50} > 5$ ,  $SI > 1$  (respecto a Mac o HepG2 indistintamente) (Tabla 19). La Figura 53 a continuación recoge la cascada de progresión completa llevada a cabo para la selección de estos compuestos.

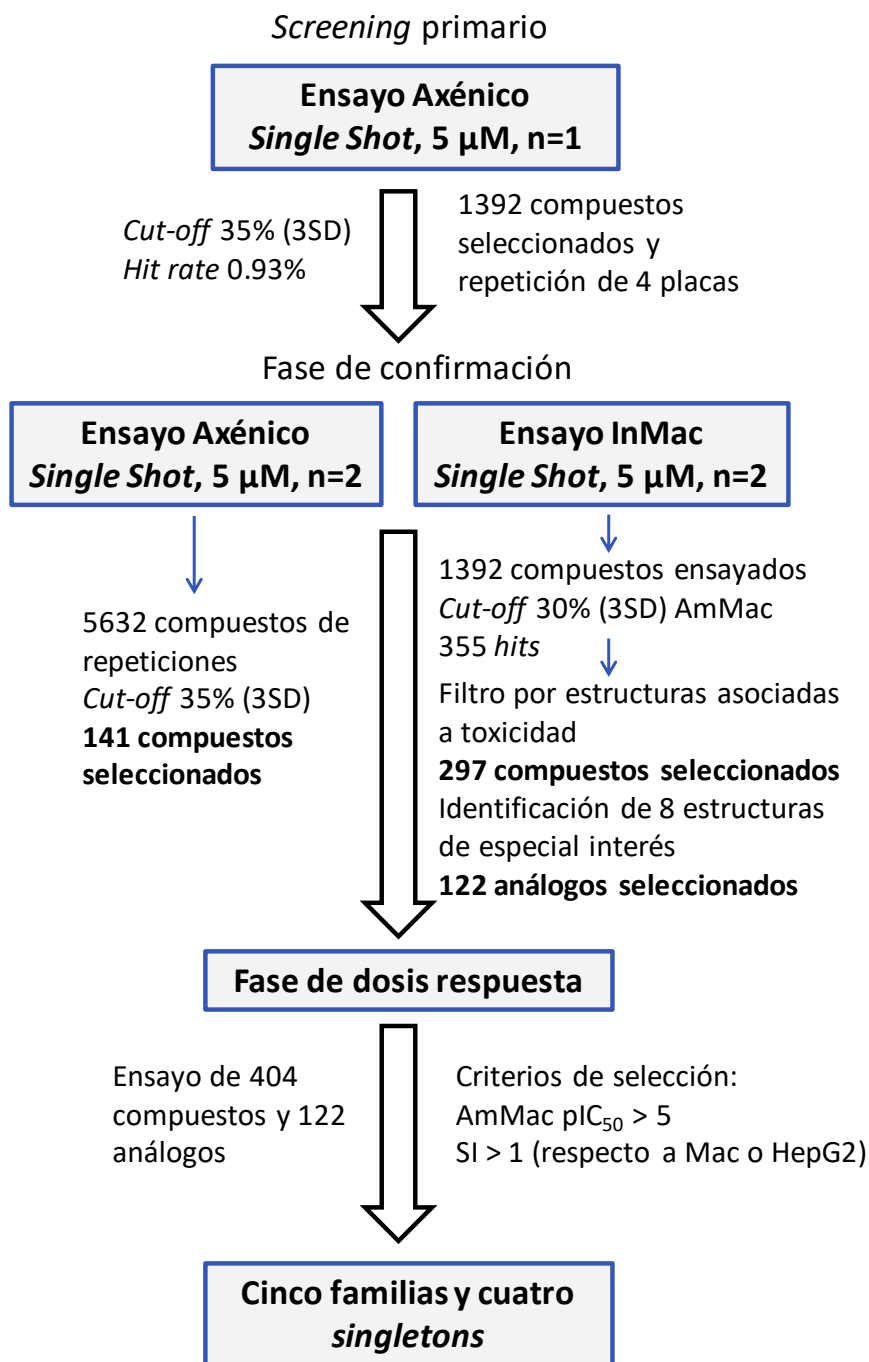


Figura 53. Cascada de progresión de los compuestos frente a *L. donovani* hasta la selección de hits.

#### 4.3.2. RESULTADOS DE LA FASE DE DOSIS RESPUESTA FRENTE A *TRYPANOSOMA CRUZI*

En la fase de dosis respuesta frente a *T. cruzi* se realizaron los ensayos  $\beta$ -galactosidasa, Imaging, tripomastigotes a 72 h y HepG2. El valor medio de  $Z'$  para los diferentes ensayos se recoge en la Tabla 18.

**Tabla 18. Valores de  $Z'$  media para los diferentes ensayos frente a *T. cruzi* en fase de dosis respuesta.**

Ensayo	$Z'$ (media $\pm$ SD)
$\beta$ -galactosidasa	0.48 $\pm$ 0.08
Tripomastigotes	0.83 $\pm$ 0.07
Imaging AmCel	0.57 $\pm$ 0.1
Imaging InfCel	0.61 $\pm$ 0.07
HepG2	0.81 $\pm$ 0.04

Entre los compuestos estándares ensayados para el control de calidad farmacológico se encuentran benznidazol, nifurtimox y posaconazol, para los que se obtuvieron valores de  $pIC_{50}$  en el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa de 5.81, 6.41 y 9.13, respectivamente. En el caso del ensayo de tripomastigotes los valores de  $pIC_{50}$  obtenidos fueron de 5.26  $\pm$  0.05 para benznidazol y 5.90  $\pm$  0.04 para nifurtimox, mientras que el posaconazol fue inactivo en este ensayo. En el ensayo de *Imaging* los valores de  $pIC_{50}$  para el parámetro AmCel fueron de 5.97  $\pm$  0.24 para benznidazol, 6.52  $\pm$  0.27 para nifurtimox y 9.11  $\pm$  0.11 para posaconazol. Estos resultados son similares a los reportados en la literatura, validando farmacológicamente estos ensayos (Alonso-Padilla et al. 2015, Peña et al. 2015, MacLean 2018, Buckner et al. 1996). En el ensayo de HepG2 se emplearon como compuestos estándares digitoxina y doxorubicina, con valores de  $pIC_{50}$  de 7.08  $\pm$  0.05 y 5.91  $\pm$  0.07, respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados en la literatura en ensayos similares de viabilidad de HepG2 (Xiao et al. 2017, Kan et al. 2014, Qiu et al. 2015).

Finalmente, como consecuencia de la falta de disponibilidad de ciertos compuestos, se ensayaron 647 compuestos junto con los 122 análogos de los previamente seleccionados. En el caso del ensayo de  $\beta$ -galactosidasa sólo se tuvo en cuenta una de las copias, ya que la segunda copia fue rechazada por no cumplir con los criterios de calidad mínimos establecidos.

En la Figura 54 se representan los resultados de los compuestos para los diferentes parámetros del ensayo de *Imaging*. La toxicidad, medida por el parámetro H9c2, es baja en general, como era de esperar por la política de Calibr de retirada de compuestos de toxicidad conocida de su colección. Al igual que ocurre en el ensayo InMac frente a *L. donovani*, se observa buena

correlación entre los parámetros de eficacia, con el desplazamiento típico en favor de AmCel. Hay que tener en cuenta que mientras que dicho parámetro representa la cuantificación del número de amastigotes por célula (cantidad de infección), el parámetro InfCel es cualitativo, representando el porcentaje de células infectadas (presencia o ausencia de amastigotes). Al igual que ocurre frente a *L. donovani*, esta estrategia basada en los dos parámetros de eficacia, nos permite diferenciar aquellos compuestos que reducen la carga parasitaria de aquellos que eliminan la presencia del parásito.

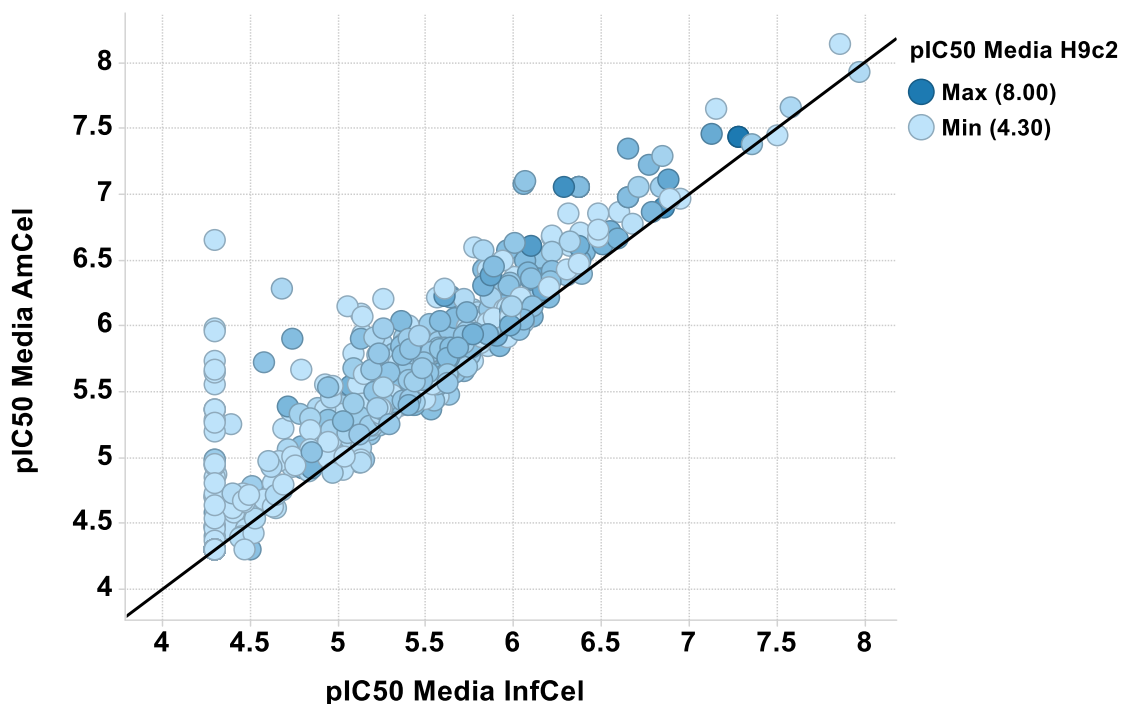


Figura 54. Representación de la correlación de los valores de  $pIC_{50}$  para cada compuesto en los parámetros AmCel e InfCel del ensayo Imaging.

El gradiente de color corresponde con el valor de  $pIC_{50}$  para el parámetro H9c2.

Al comparar los resultados obtenidos de toxicidad en cardiomiocitos frente a la toxicidad en hepatocitos (Figura 55), observamos buena correlación, aunque en general se manifiesta una mayor toxicidad en las células H9c2. Hay que tener en cuenta que dichos cardiomiocitos se encuentran infectados por *T. cruzi* en mayor o menor medida, mientras que las células hepáticas en el ensayo de citotoxicidad no lo están.

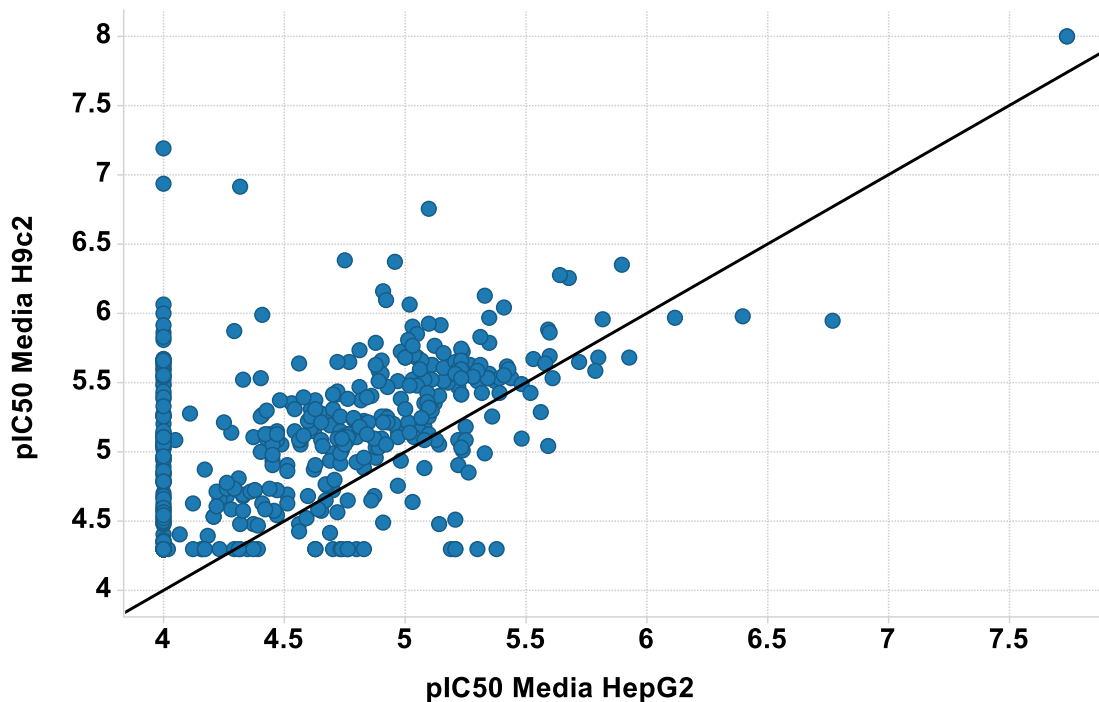


Figura 55. Representación de la correlación entre las dos medidas de toxicidad: H9c2 y HepG2.

Finalmente, nueve familias y diez *singletons* fueron seleccionados siguiendo los siguientes criterios: AmCel  $pIC_{50} > 6$  en al menos una de las copias, SI  $> 2$  (respecto a H9c2 o HepG2 indistintamente) y actividad frente a tripomastigotes (Tabla 19). La Figura 56 a continuación recoge la cascada de progresión completa llevada a cabo para la selección de estos compuestos.

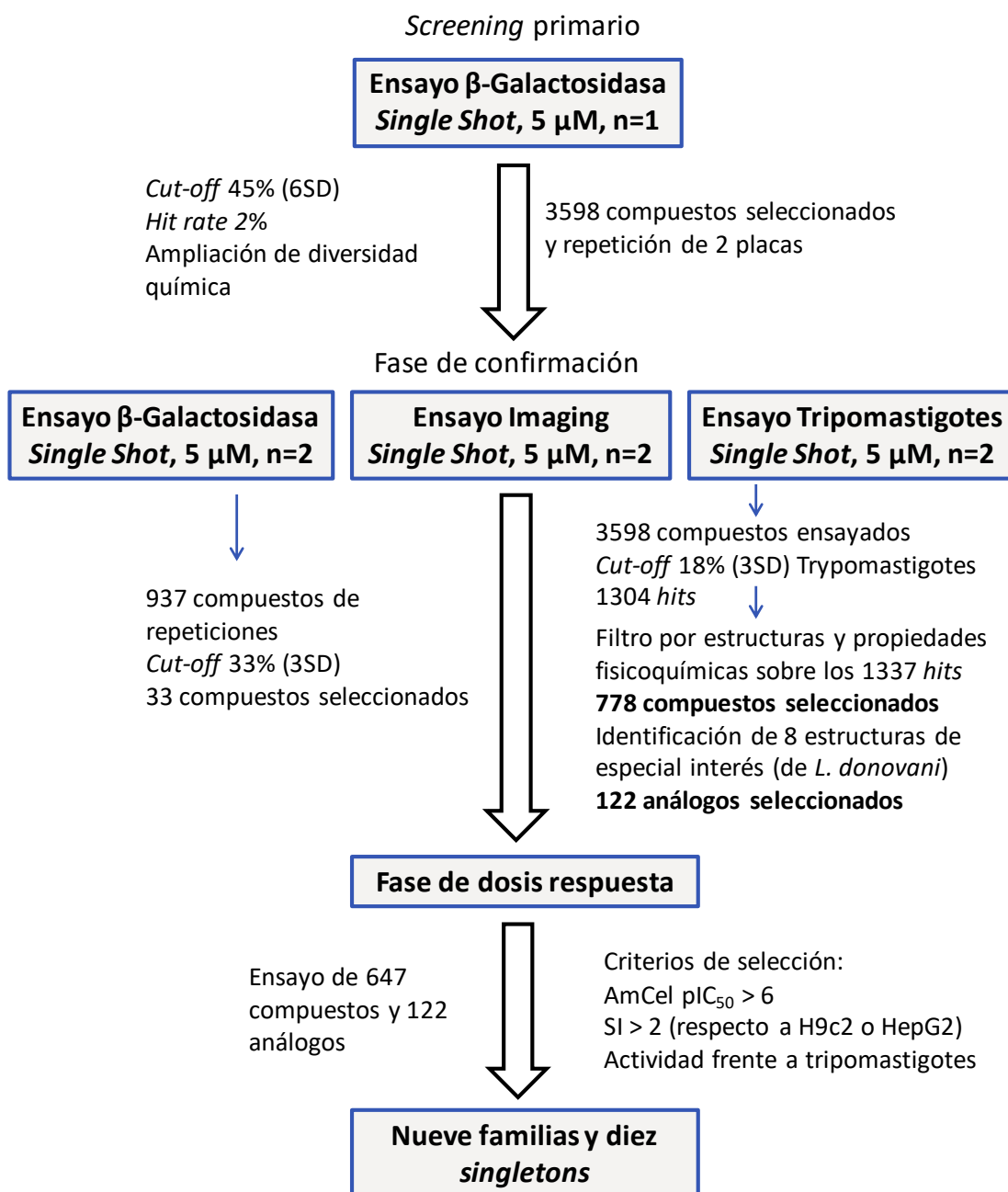


Figura 56. Cascada de progresión de los compuestos frente a *T. cruzi* hasta la selección de hits.

#### 4.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS HITS Y ANÁLOGOS

Todos los *hits* seleccionados a partir de los resultados de la fase de dosis respuesta (Figura 57 y Figura 58) fueron caracterizados biológicamente frente a ambos parásitos empleando los ensayos descritos previamente en la presente Tesis: InMac e InMac HS frente a *L. donovani*; *Imaging*, tripomastigotes a 24, 48 y 72 horas de incubación y *Rate of Kill* frente a *T. cruzi*. Además, en esta fase se realizó una confirmación de la actividad frente a HepG2 en las instalaciones de Calibr.

En la Tabla 19 se recogen todos los valores de pIC<sub>50</sub> media de los ensayos para cada compuesto teniendo en cuenta tanto los resultados de la fase de dosis respuesta como aquellos estudios realizados en la fase de caracterización de *hits*.

Los análogos disponibles en Calibr de estos *hits* fueron ensayados en InMac (*L. donovani*), *Imaging* (*T. cruzi*) y frente a tripomastigotes a 72 horas de incubación. En la Tabla 20 se exponen los resultados para cada familia de compuestos expresados en rango de pIC<sub>50</sub> media de los compuestos activos y no tóxicos presentes en cada una. La Figura 59 a continuación muestra los resultados para los hits y análogos de las diferentes familias frente a *T. cruzi* y *L. donovani*.

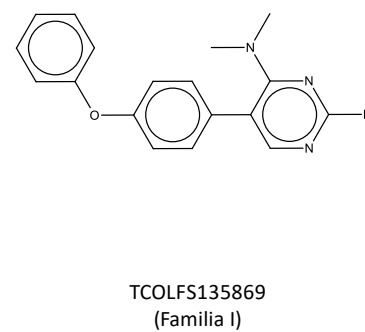
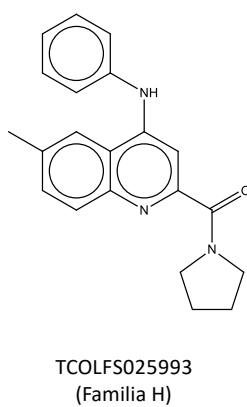
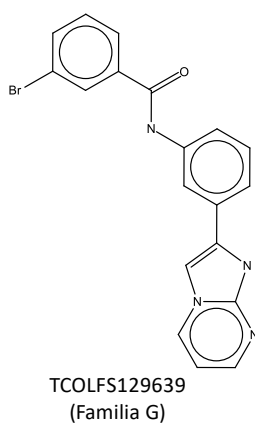
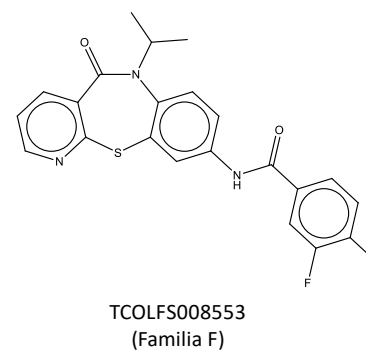
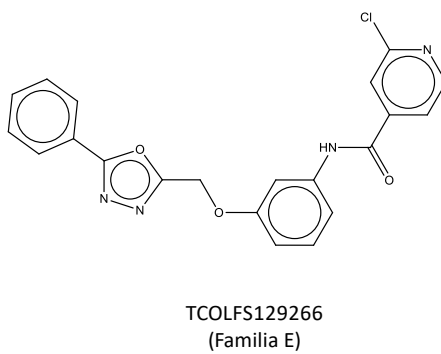
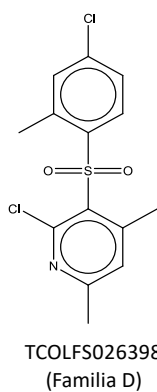
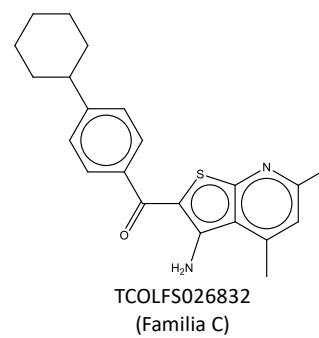
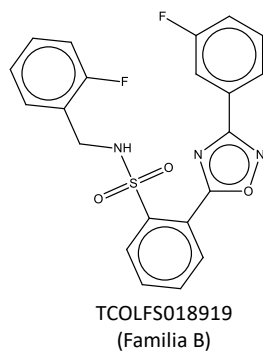
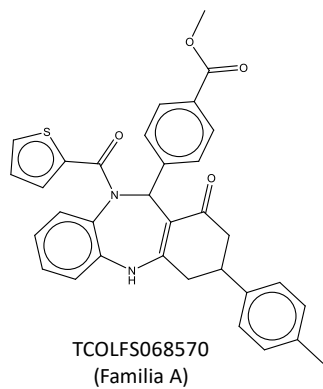


Figura 57. Estructuras de los *hits* seleccionados clasificados por familias.

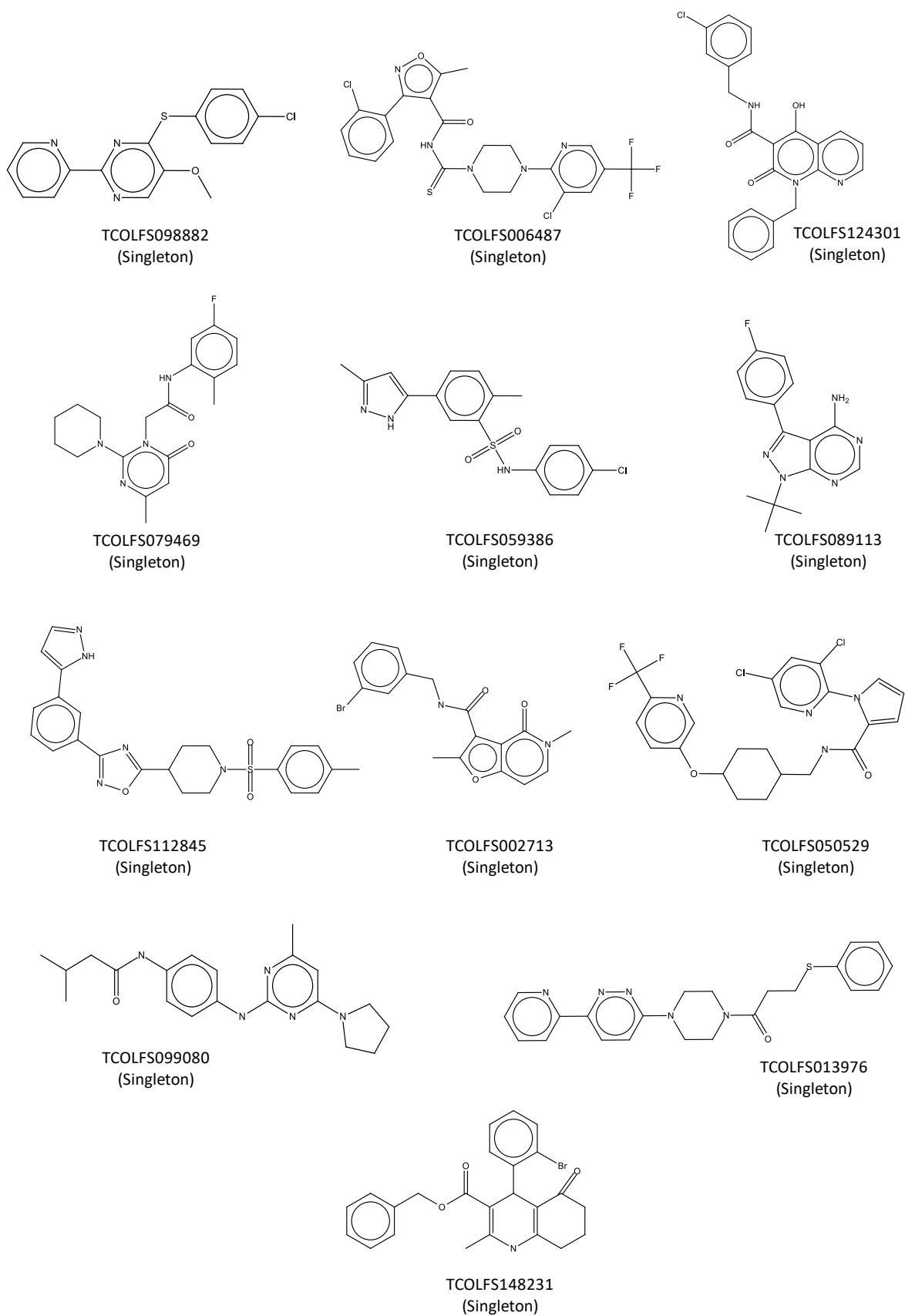


Figura 58. Estructuras de los *singletons* seleccionados.

**Tabla 19. Resultados de los *hits* en los ensayos de *L. donovani*, *T. cruzi* y citotoxicidad.**

Los compuestos han sido clasificados en base a su actividad antiparasitaria. Los guiones representan compuestos sin dato para un determinado ensayo (no todos los compuestos estaban disponibles para la realización de todos los ensayos).

Actividad	Compuesto	Familia	<i>L. donovani</i>			<i>T. cruzi</i>			HepG2 pIC <sub>50</sub>
			Axénico pIC <sub>50</sub>	InMac pIC <sub>50</sub>	InMac HS pIC <sub>50</sub>	Imaging pIC <sub>50</sub>	Tripomastigotes pIC <sub>50</sub>	Rate of Kill	
Ambos parásitos	TCOLFS068570	A	5.93 ± 0.01	AmMac 6.3 ± 0.25 InfCel 6.27 ± 0.2 Mac <4.3	AmMac HS 6.17 ± 0.19 InfCel HS 6.09 ± 0.11 Mac HS 4.53 ± 0.28	AmCel 5.85 ± 0.11 InfCel 4.4 ± 0.25 H9c2 <4.3	24h <4.3 48h <4.3 72h <4.3	Inactivo	<4
	TCOLFS018919	B	5.80 ± 0.15	AmMac 5.68 ± 0.30 InfCel 5.09 ± 0.65 Mac <4.3	AmMac HS 4.89 ± 0.32 InfCel HS 4.75 ± 0.30 Mac HS <4.3	AmCel 5.71 ± 0.30 InfCel 5.38 ± 0.30 H9c2 <4.3	24h <4.3 48h <4.3 72h 4.53 ± 0.27	Inactivo	<4
	TCOLFS026832	C	6.53 ± 0.03	AmMac 6.47 ± 0.26 InfCel 6.32 ± 0.17 Mac 4.5 ± 0.31	AmMac HS 6.13 ± 0.05 InfCel HS 5.96 ± 0.09 Mac HS 4.62 ± 0.45	AmCel 7.98 ± 0.23 InfCel 7.64 ± 0.28 H9c2 <4.3	24h 7.28 48h 7.08 72h 7.41 ± 0.19	Estático (no similar al posaconazol)	<4
	TCOLFS026398	D	-	AmMac 5.09 ± 0.06 InfCel 5.03 ± 0.1 Mac <4.3	-	AmCel 6.65 ± 0.2 InfCel 6.37 ± 0.2 H9c2 <4.3	24h - 48h - 72h 6.06 ± 0.16	Estático	<4
	TCOLFS129266	E	6.54 ± 0.01	AmMac 6.28 ± 0.33 InfCel 5.62 ± 0.78 Mac 4.90 ± 0.18	-	AmCel 6.77 ± 0.01 InfCel 6.68 ± 0.03 H9c2 4.42 ± 0.02	24h - 48h - 72h 6.24 ± 0.01	-	4.69 ± 0.01

Actividad	Compuesto	Familia	<i>L. donovani</i>			<i>T. cruzi</i>			HepG2 pIC <sub>50</sub>
			Axénico pIC <sub>50</sub>	InMac pIC <sub>50</sub>	InMac HS pIC <sub>50</sub>	Imaging pIC <sub>50</sub>	Tripomastigotes pIC <sub>50</sub>	Rate of Kill	
	TCOLFS098882	Singleton	5 ± 0.04	AmMac 5.82 ± 0.55 InfCel 5.2 ± 0.09 Mac 4.46 ± 0.22	-	AmCel 5.37 ± 0.06 InfCel 5.17 ± 0.24 H9c2 5.61	24h - 48h - 72h 5.66 ± 0.01	-	<4
	TCOLFS006487	Singleton	5.23 ± 0.05	AmMac 5.64 ± 0.32 InfCel 5.38 ± 0.09 Mac 4.53 ± 0.25	-	AmCel 5.89 ± 0.06 InfCel 5.79 ± 0.06 H9c2 5.28 ± 0.1	24h - 48h - 72h 5.94 ± 0.02	-	4.33 ± 0.38
<i>L. donovani</i>	TCOLFS079469	Singleton	6.38 ± 0.03	AmMac 6.25 ± 0.28 InfCel 4.62 ± 0.46 Mac <4.3	-	AmCel <4.3 InfCel <4.3 H9c2 <4.3	24h - 48h - 72h <4.3	-	<4
	TCOLFS124301	Singleton	5.51	AmMac 5.46 ± 0.04 InfCel 5.28 ± 0.08 Mac <4.3	-	-	-	-	4.58 ± 0.82
<i>T. cruzi</i>	TCOLFS008553	F	-	AmMac <4.3 InfCel <4.3 Mac 4.42 ± 0.19	AmMac HS <4.3 InfCel HS <4.3 Mac HS 4.52 ± 0.27	AmCel 6.3 ± 0.11 InfCel 5.88 ± 0.11 H9c2 4.36 ± 0.08	24h 5.66 ± 0.06 48h 5.31 ± 0.08 72h 5.44 ± 0.05	Estático (no similar al posaconazol)	<4
	TCOLFS129639	G	-	AmMac 5.01 ± 0.17 InfCel 4.31 ± 0.01 Mac 4.74 ± 0.21	AmMac HS 4.78 ± 0.15 InfCel HS 4.52 ± 0.06 Mac HS 4.42 ± 0.16	AmCel 6.45 ± 0.11 InfCel 6.13 ± 0.27 H9c2 4.41 ± 0.12	24h 4.8 48h 5.27 72h 5.84 ± 0.08	Estático	<4

Actividad	Compuesto	Familia	<i>L. donovani</i>			<i>T. cruzi</i>			HepG2 pIC <sub>50</sub>
			Axénico pIC <sub>50</sub>	InMac pIC <sub>50</sub>	InMac HS pIC <sub>50</sub>	Imaging pIC <sub>50</sub>	Tripomastigotes pIC <sub>50</sub>	Rate of Kill	
	TCOLFS025993	H	-	AmMac 4.84 ± 0.21 InfCel 4.52 ± 0.24 Mac 4.36 ± 0.09	AmMac HS 4.64 ± 0.43 InfCel HS <4.3 Mac HS 4.44 ± 0.28	AmCel 6.68 ± 0.2 InfCel 6.49 ± 0.19 H9c2 <4.3	24h <4.3 48h <4.3 72h 5.59 ± 0.11	Estático	<4
	TCOLFS059386	Singleton	-	-	-	AmCel 5.9 ± 0.06 InfCel 5.82 ± 0.1 H9c2 <4.3	24h - 48h - 72h 5.27 ± 0.01	Cida	<4
	TCOLFS089113	Singleton	-	AmMac <4.3 InfCel <4.3 Mac <4.3	AmMac HS 4.73 ± 0.01 InfCel HS 4.41 ± 0.16 Mac HS 4.89 ± 0.04	AmCel 6.3 ± 0.12 InfCel 6.03 ± 0.18 H9c2 <4.3	24h <4.3 48h <4.3 72h 4.83 ± 0.77	Estático	<4
	TCOLFS135869	I	-	-	-	AmCel 6.85 ± 0.14 InfCel 6.48 ± 0.1 H9c2 <4.3	24h - 48h - 72h 6.33 ± 0.06	-	<4
	TCOLFS112845	Singleton	-	-	-	AmCel 6.07 ± 0.04 InfCel 5.98 ± 0.07 H9c2 <4.3	24h - 48h - 72h 5.27 ± 0.01	Estático	<4
	TCOLFS002713	Singleton	-	-	-	AmCel 6.27 ± 0.01 InfCel 5.97 ± 0.08 H9c2 <4.3	24h - 48h - 72h 5.72 ± 0.01	Estático	<4

Actividad	Compuesto	Familia	<i>L. donovani</i>			<i>T. cruzi</i>			HepG2 pIC <sub>50</sub>
			Axénico pIC <sub>50</sub>	InMac pIC <sub>50</sub>	InMac HS pIC <sub>50</sub>	Imaging pIC <sub>50</sub>	Tripomastigotes pIC <sub>50</sub>	Rate of Kill	
	TCOLFS050529	Singleton	-	-	-	AmCel 6.0 ± 0.01 InfCel 5.88 ± 0.08 H9c2 <4.3	24h - 48h - 72h 4.42 ± 0.1	Estático	<4
	TCOLFS099080	Singleton	-	-	-	AmCel 6.35 ± 0.02 InfCel 5.87 ± 0.11 H9c2 <4.3	24h - 48h - 72h 5.64 ± 0.01	Estático	4.73
	TCOLFS013976	Singleton	-	-	-	AmCel 6.13 ± 0.03 InfCel 5.76 ± 0.1 H9c2 <4.3	24h - 48h - 72h 5.69 ± 0.01	Tóxico	<4
	TCOLFS148231	Singleton	-	-	-	AmCel 6.21 InfCel 5.87 ± 0.11 H9c2 4.85 ± 0.05	24h - 48h - 72h 5.64	Tóxico	<4

**Tabla 20. Rango de actividad por familias en los ensayos de *L. donovani* y *T. cruzi*.**

Los compuestos calificados como activos son aquellos con valores de AmMac o AmCel pIC<sub>50</sub> >5. Sólo los compuestos no tóxicos han sido considerados para la elaboración de esta tabla (Mac o H9c2 pIC<sub>50</sub> <5).

Familia	Número de compuestos ensayados	<i>L. donovani</i>		<i>T. cruzi</i>		
		Número de activos	Rango pIC <sub>50</sub> InMac	Número de activos	Rango pIC <sub>50</sub> Imaging	Rango pIC <sub>50</sub> Tripomastigotes
A	15	2	AmMac 5.06-6.3 InfCel 4.91-6.27 Mac <4.3	6	AmCel 5.05-5.85 InfCel <4.3-4.91 H9c2 <4.3-4.77	<4.3-4.88
B	8	5	AmMac 5.21-5.68 InfCel 4.91-5.19 Mac <4.3-4.6	8	AmCel 5.16-5.73 InfCel 4.74-5.38 H9c2 <4.3-4.52	<4.3-5.13
C	58	10	AmMac 5.0-6.47 InfCel 4.62-6.32 Mac <4.3-4.87	23	AmCel 5.02-7.98 InfCel <4.3-7.64 H9c2 <4.3-4.96	<4.3-7.41
D	3	1	AmMac 5.09 InfCel 5.03 Mac <4.3	3	AmCel 6.18-6.65 InfCel 5.81-6.37 H9c2 <4.3	5.54-6.06
E	13	1	AmMac 6.28 InfCel 5.62 Mac 4.9	7	AmCel 5.06-6.77 InfCel <4.3-6.68 H9c2 <4.3-4.42	<4.3-6.24

Familia	Número de compuestos ensayados	<i>L. donovani</i>		<i>T. cruzi</i>		
		Número de activos	Rango pIC <sub>50</sub> InMac	Número de activos	Rango pIC <sub>50</sub> Imaging	Rango pIC <sub>50</sub> Tripomastigotes
F	13	4	AmMac 5.0-5.85 InfCel <4.3-5.15 Mac <4.3-4.86	10	AmCel 5.04-6.63 InfCel 4.43-6.24 H9c2 <4.3-4.51	4.35-5.92
G	2	1	AmMac 5.01 InfCel 4.31 Mac 4.74	2	AmCel 6.02-6.45 InfCel 5.82-6.13 H9c2 <4.3-4.41	5.41-5.84
H	19	1	AmMac 5.44 InfCel 5.39 Mac 4.51	6	AmCel 5.05-6.68 InfCel 4.97-6.49 H9c2 <4.3-4.4	<4.3-5.59
I	5	0	-	3	AmCel 5.07-6.85 InfCel <4.3-6.48 H9c2 <4.3-4.51	<4.3-6.33

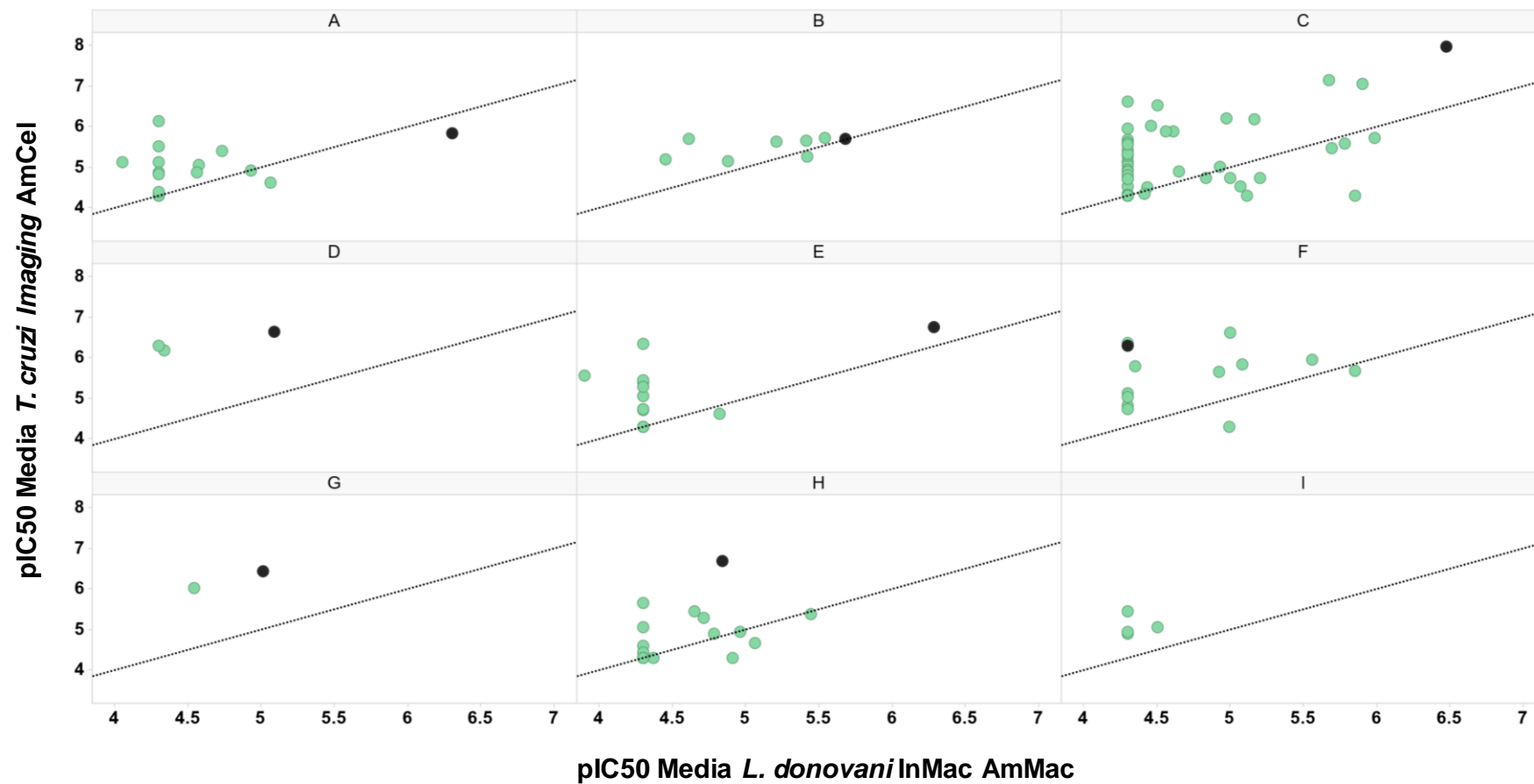


Figura 59. Distribución de los *hits* y análogos de las diferentes familias ensayados considerando los outputs de InMac AmMac e *Imaging AmCel* para *L. donovani* y *T. cruzi*, respectivamente.

El color negro representa los *hits* y el color verde los análogos. Sólo se representan aquellos compuestos que pudieron ser ensayados en ambos ensayos, ya que no todos estaban disponibles en cantidad suficiente para ello.

Como se puede observar en la Figura 59, en la búsqueda de análogos presentes en la colección de Calibr en general no se encontraron moléculas con mayor eficacia que los compuestos originales de las distintas familias. Como excepción encontramos la familia F, en la que el compuesto de partida es inactivo frente a *L. donovani* y sin embargo se encontraron análogos con potencias en AmMac > 5; y la familia A, en la que algunos análogos presentaron mayor potencia frente a *T. cruzi*, aunque perdiendo la eficacia frente a *L. donovani*. Con este experimento se demuestra la presencia de SAR (relación estructura- actividad, por sus siglas en inglés) en las diferentes familias, lo que abre la puerta a la síntesis de nuevos análogos con el objetivo de mejorar la eficacia y/o seguridad de estos productos, sin perder de vista la idoneidad de sus propiedades fisicoquímicas.

Como se ha mostrado en la Tabla 19, los hits fueron caracterizados en otros ensayos como InMac HS, tripomastigotes a distintos tiempos de incubación y *Rate of Kill*.

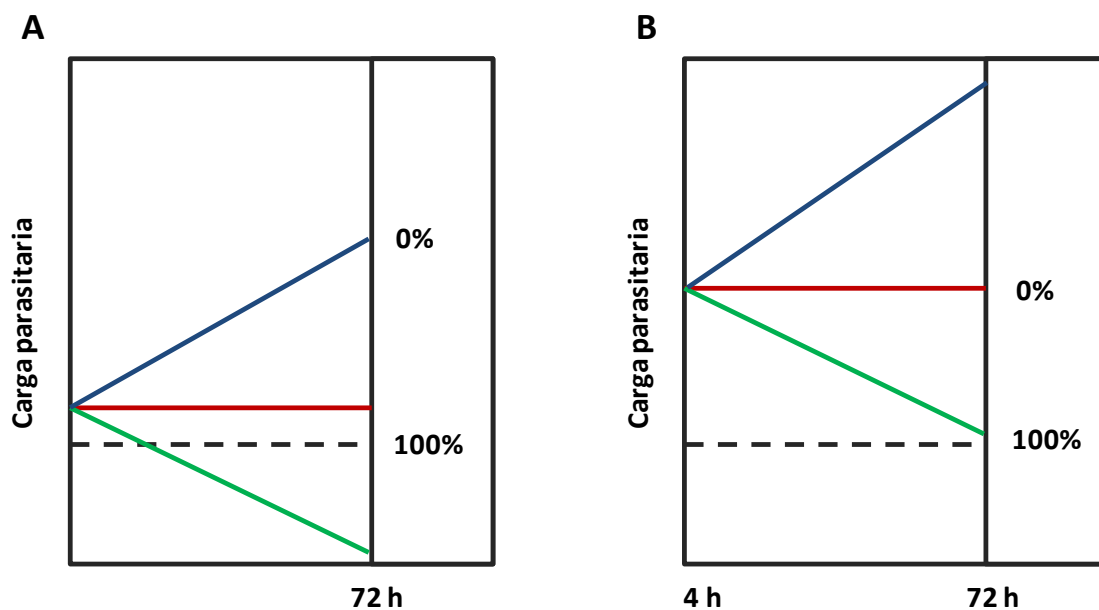
En el caso de los hits de *L. donovani*, la inclusión de suero de caballo en lugar de FBS en el ensayo InMac HS permite eliminar los parásitos extracelulares derivados del proceso de infección, de modo que se impide la reinfección de los macrófagos y la medida de actividad del compuesto representa únicamente el efecto sobre la replicación de los amastigotes intracelulares. Los compuestos activos *in vivo* son activos en este ensayo (Tegazzini et al. 2016).

El ensayo frente a tripomastigotes de *T. cruzi* en esta fase del proyecto se realizó a tres tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas) con el fin de obtener información sobre la velocidad de acción de los compuestos junto con la determinación de su capacidad cida. Como ya se ha comentado, los compuestos activos en el ensayo de tripomastigotes son probablemente cidas, y aquellos activos a tiempos de incubación cortos serán priorizados como compuestos de acción rápida. Este ensayo permite además la clasificación de compuestos con mecanismo de acción similar a los azoles, que tienen baja prioridad en la búsqueda de nuevos fármacos frente a *T. cruzi*. Aunque los compuestos seleccionados son cidas frente a la forma tripomastigote, dicha cidalidad debe confirmarse frente a amastigotes intracelulares.

Para ello se realizó el ensayo *Rate of Kill*, previamente descrito en la sección 3.4.3 de la presente Tesis, sobre los compuestos disponibles de los previamente seleccionados como activos frente a *T. cruzi*.

Este ensayo, a pesar de ser muy similar al ensayo de *Imaging* en cuanto a su procedimiento, presenta una diferencia fundamental en cuanto a la carga parasitaria inicial (MOI 1 en el ensayo de *Imaging* y MOI 7 en el ensayo de *Rate of Kill*). Además, al tratarse de un ensayo cinético y

emplear para la normalización de los resultados los datos obtenidos a las 4 horas de infección, permite diferenciar compuestos cidas de aquellos estáticos frente a amastigotes intracelulares (De Rycker et al. 2016). Como se muestra en la Figura 60, al aumentar la carga parasitaria, se incrementa la ventana entre el límite de detección y la carga parasitaria inicial, permitiendo la diferenciación de los compuestos estáticos y cidas. Al igual que ocurre en el ensayo de *Imaging*, este ensayo permite evaluar al mismo tiempo la eficacia y la toxicidad de los compuestos.



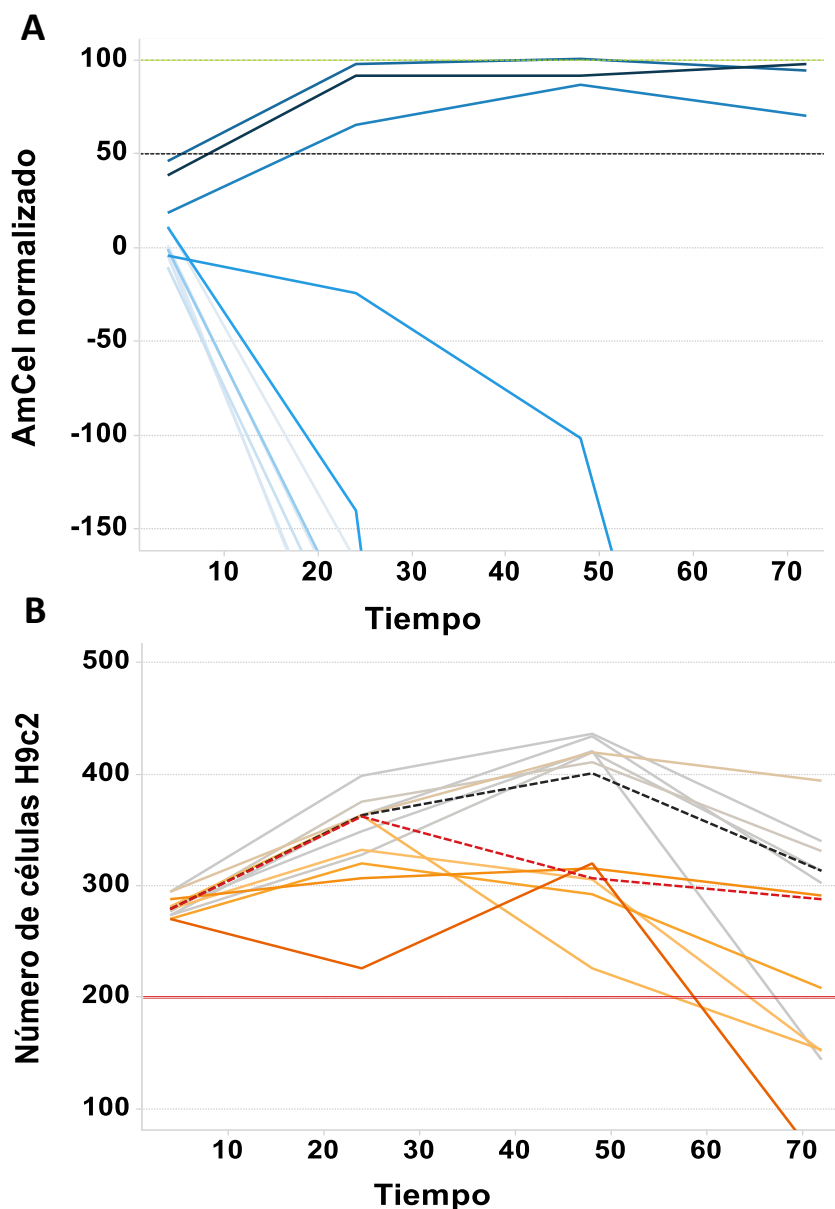


Figura 61. Representación gráfica de los resultados de *Rate of Kill* en los parámetros AmCel y H9c2 para el compuesto TCOLFS059386.

El gradiente de color representa las diferentes concentraciones de compuesto de mayor a menor. Siendo la concentración superior de 50  $\mu\text{M}$  y la menor de 0.062  $\mu\text{M}$ . En la gráfica B, las líneas punteadas negra y roja representan los controles infectados y no infectados respectivamente.

En el análisis del ensayo de RoK, los resultados se comparan con los obtenidos para los compuestos estándares benznidazol, nifurtimox y posaconazol. Como ya se ha comentado anteriormente, este ensayo nos permite diferenciar compuestos cidas y estáticos frente a los amastigotes intracelulares de *T. cruzi*. Como queda reflejado en la Tabla 21, el posaconazol no tiene comportamiento cida, mientras que los fármacos aprobados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, benznidazol y nifurtimox, sí presentan dicha capacidad.

Tomando como referencia el tratamiento de elección para la enfermedad de Chagas, benznidazol, el compuesto TCOLFS059386 presenta un efecto máximo cercano al 100% mientras que el benznidazol logra un efecto máximo de 83.05%. Aunque presentan la misma concentración mínima cida (MCC), de 5.56  $\mu\text{M}$ , el compuesto descubierto en este *screening* logra dicha MCC en 24 horas, mientras que el benznidazol necesita 72 horas para lograr dicho efecto. Por último, al evaluar el efecto sobre las células H9c2, se observa que la concentración mínima tóxica del benznidazol es menor (16.67  $\mu\text{M}$ ) comparada con el compuesto TCOLFS059386 (50  $\mu\text{M}$ ). En el caso del nifurtimox, el máximo efecto y la MCC son similares a los de TCOLFS059386, pero este último presenta menor toxicidad y una mayor velocidad de acción. Por lo tanto, al comparar los resultados obtenidos para este compuesto con los de los compuestos estándares benznidazol, nifurtimox y posaconazol se observa la superioridad del compuesto TCOLFS059386 en los diferentes parámetros.

**Tabla 21. Parámetros de *Rate of Kill* para el compuesto TCOLFS059386, benznidazol, nifurtimox y posaconazol.**

Parámetro	TCOLFS059386	Benznidazol	Nifurtimox	Posaconazol
Max. Efecto (%)	98.01	83.05	102.39	34.74
MCC (50%) ( $\mu\text{M}$ )	5.56	5.56	5.56	N/A
CCE ( $\mu\text{M}$ )	5.56	5.56	5.56	0.02
T lag Cmax (h)	4	4	4	48
T lag MCC (h)	4	4	4	N/A
T 50% cida Cmax (h)	24	24	24	48
T 50% cida MCC (h)	24	72	72	N/A
Cmin tox c2 ( $\mu\text{M}$ )	50	16.67	5.56	0.02

Tras el desarrollo de los *screenings* descritos en esta Tesis siguiendo sendas cascadas de progresión, junto con la posterior caracterización de *hits* y análogos de los mismos, y considerando como criterio de actividad AmMac > 5, y como criterio de toxicidad Mac o HepG2 < 5, se han identificado un total de 29 compuestos frente a *L. donovani*, de los cuales 25 pertenecen a 8 familias y 4 son *singletons*. Y considerando como criterio de actividad AmCel > 5 y como criterio de toxicidad H9c2 o HepG2 < 5, se han identificado un total de 78 compuestos frente a *T. cruzi*, de los cuales 68 se agrupan en 9 familias y 10 son *singletons*. De todos ellos, uno muestra actividad cida frente a amastigotes en el ensayo de *Rate of Kill* (Figura 62).

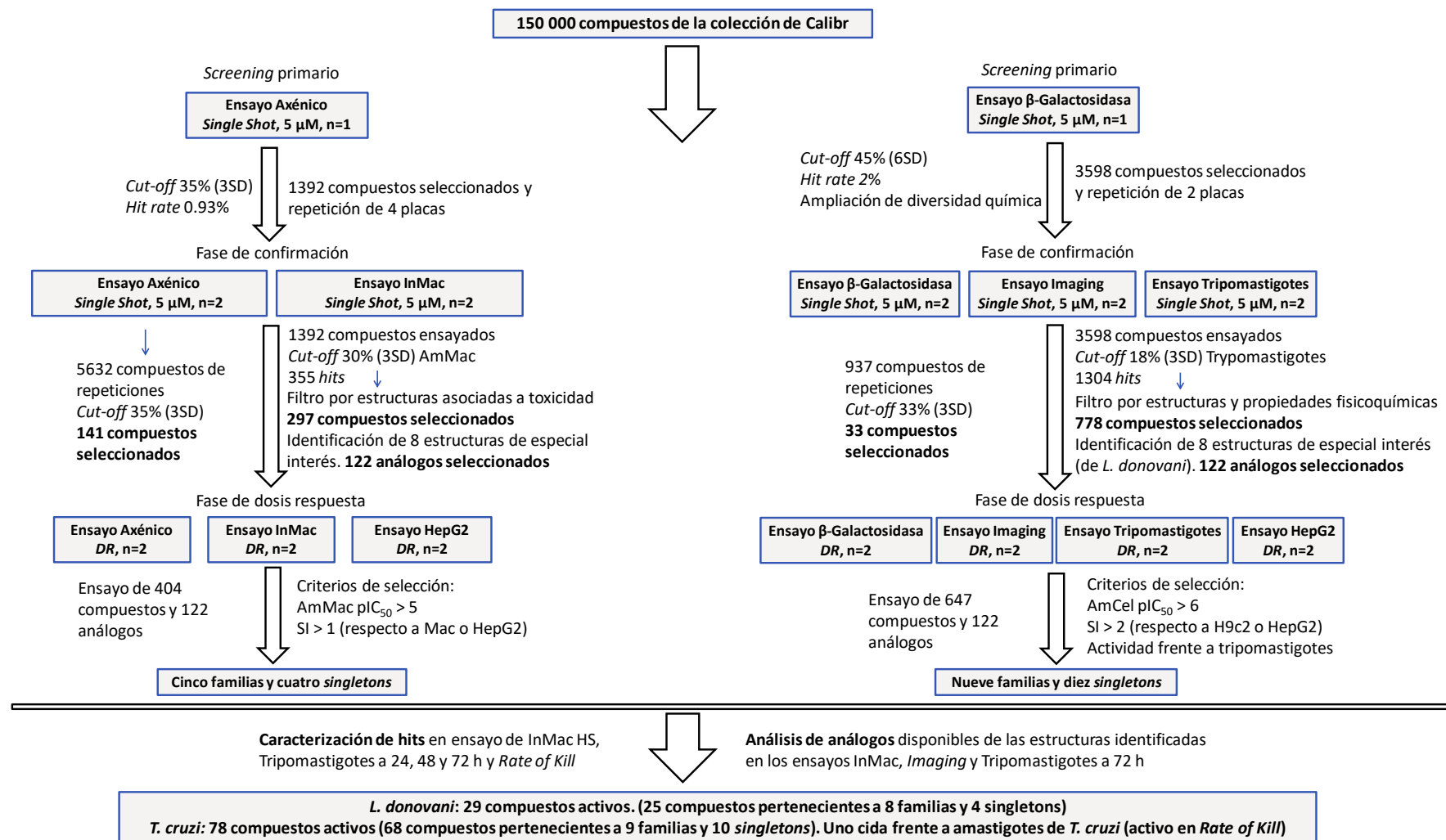


Figura 62. Resumen de los resultados de ambos procesos de *screening* siguiendo las cascadas de progresión.

Como parte de la caracterización de los *hits* se realizó una búsqueda en bases de datos internas de GSK para comprobar si se trataba de estructuras novedosas o por el contrario habían sido detectadas previamente como moléculas activas frente a estos parásitos.

Por una parte, se concluyó que nueve compuestos ya eran conocidos por su actividad frente a *L. donovani* o frente a *T. cruzi* (Tabla 22) (Peña et al. 2015, Khare et al. 2016). La identificación de ciertas estructuras conocidas permite afirmar que ambas cascadas de progresión han sido validadas, es decir, los ensayos empleados son capaces de identificar moléculas con demostrada actividad antiparasitaria, lo que prueba su sensibilidad a nivel farmacológico a los mecanismos de acción de dichos compuestos. Al enfrentar nueva diversidad química frente a cascadas de progresión validadas, podremos detectar tanto nuevos mecanismos de acción como nuevas moléculas que actúen frente a dianas ya conocidas.

**Tabla 22. Compuestos identificados en este *screening* con actividad ya conocida frente a estos parásitos.**

Compuesto	Familia	Análogo	Referencia
TCOLFS129266	E	TCMDC-143197	(Peña et al. 2015)
TCOLFS006487	<i>Singleton</i>	TCMDC-143247	
		TCMDC-143097	
TCOLFS059386	<i>Singleton</i>	TCMDC-143193	
		TCMDC-143194	
TCOLFS089113	<i>Singleton</i>	TCMDC-143426	
TCOLFS135869	I	TCMDC-143248	
TCOLFS050529	<i>Singleton</i>	TCMDC-143465	
TCOLFS099080	<i>Singleton</i>	TCMDC-143109	
TCOLFS013976	<i>Singleton</i>	TCMDC-143511	
TCOLFS129639	G	GNF6702	(Khare et al. 2016)

Por otro lado, doce familias y *singletons* han sido identificados como puntos de partida novedosos en la búsqueda de fármacos frente a estas dos enfermedades desatendidas. De entre ellas, siete son activas frente a ambos parásitos.

La búsqueda en bases de datos de Calibr reveló que estas siete estructuras no habían sido identificadas en otros *screening* frente a diversos patógenos: *Plasmodium falciparum* en estadios eritrocíticos (datos no publicados), *Cryptosporidium parvum* en estadios intracelulares asexuales (Love et al. 2017), *Drosophila* infectada con *Wolbachia* (Bakowski et al. 2019) y

*Mycobacterium tuberculosis* en cultivo intramacrófago (datos no publicados). Este hecho refuerza la hipótesis de la especificidad y selectividad de los compuestos seleccionados mediante los *screenings* descritos en la presente Tesis Doctoral.

#### 4.5. ESTUDIO DE LA COMBINACIÓN CON BENZNIDAZOL EN EL ENSAYO *RATE OF KILL*

Tras la caracterización de los *hits* se decidió estudiar en el ensayo *Rate of Kill* el compuesto TCOLFS008553, perteneciente a la familia F, en combinación con benznidazol, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2 de esta Tesis para la preparación de las placas y en la sección 3.5 para su análisis.

Este compuesto presentaba un perfil poco frecuente: actividad en el ensayo de tripomastigotes y comportamiento estático en el ensayo de *Rate of Kill*. Con la hipótesis de que compuestos con este perfil de actividad podrían presentar un efecto sinérgico con compuestos cidas frente a los amastigotes, como es el caso del benznidazol, y por lo tanto, permitir disminuir su dosis, se decidió evaluar en el ensayo de *Rate of Kill* el posible efecto sinérgico de esta combinación.

Al representar el número de amastigotes por célula (normalizados respecto al control 1 a 4 h y los controles 2 a cada tiempo), frente al tiempo de incubación (Figura 63), se observa que a las 72 horas de incubación se obtienen resultados similares para la condición de 50  $\mu\text{M}$  de benznidazol (monoterapia) y la combinación de 2.5  $\mu\text{M}$  de TCOLFS008553 (Calibr) con 5  $\mu\text{M}$  de benznidazol.

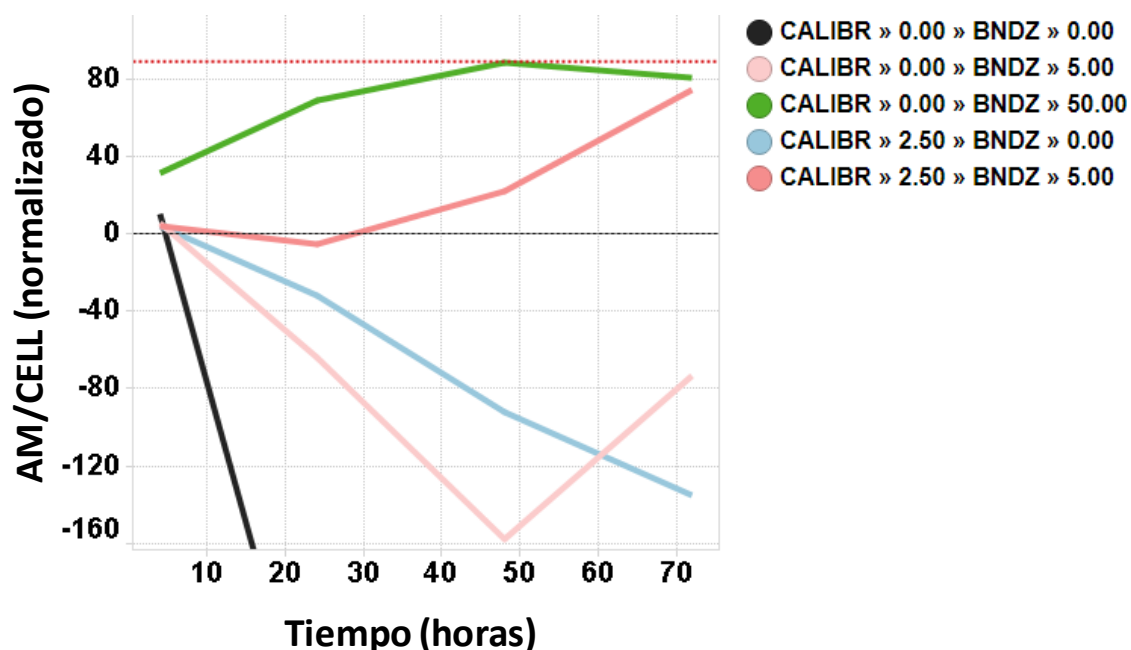


Figura 63. Representación de los resultados del parámetro AmCel en el ensayo de *Rate of Kill* de la combinación de benznidazol (BNDZ) y TCOLFS008553 (Calibr).

La línea discontinua roja representa el control no infectado, mientras que la línea discontinua negra representa el control infectado en la placa revelada a las 4 h de incubación, o lo que es lo mismo, la carga parasitaria inicial, que se emplea para la normalización.

En otras palabras, el 100% de inhibición del crecimiento de los amastigotes intracelulares en el ensayo de Rate of Kill a 72 horas de incubación se logra con 50  $\mu\text{M}$  de benznidazol de forma individual, o bien disminuyendo 10 veces la concentración de benznidazol, en combinación con 2.5  $\mu\text{M}$  de TCOLFS008553. Dicha combinación no presenta toxicidad *in vitro* en el ensayo de *Rate of Kill*.

Con este experimento se ha observado un claro efecto sinérgico de ambos compuestos en este ensayo *in vitro* que permite evaluar la cidalidad de los compuestos frente a los amastigotes intracelulares de *T. cruzi*.

Dada la alta toxicidad del benznidazol en su uso clínico, poder disminuir su dosis manteniendo el mismo efecto parasiticida es una de las opciones para mejorar la adhesión al tratamiento.

#### 4.6. APORTACIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL EN EL CONTEXTO DE LAS ESTRATEGIAS PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS FÁRMACOS FRENTE A *L. DONOVANI* Y *T. CRUZI*

Existen varias estrategias a la hora de identificar y optimizar nuevas moléculas frente a *Leishmania* y *T. cruzi*: el descubrimiento de nuevos fármacos *de novo* mediante el *screening* de librerías, como es el caso descrito en esta Tesis; las terapias en combinación, como se ha explorado en este proyecto; el desarrollo de nuevas formulaciones de principios activos ya conocidos; y el reposicionamiento terapéutico o *drug repurposing* (Alcântara et al. 2018). Estas últimas estrategias, alternativas al *screening de novo*, son consideradas como una opción prometedora en la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de estas enfermedades, logrando reducir costes y el tiempo necesario de desarrollo (Charlton et al. 2018).

Mediante el desarrollo de nuevas formulaciones de principios activos ya conocidos, puede lograrse una mejora en la eficacia y perfil de seguridad de los fármacos. En ese sentido se orientan diversas investigaciones enfocadas en la mejora de la formulación de la anfotericina B y el benznidazol (Ordóñez-Gutiérrez et al. 2007, Ruiz et al. 2014, Fonseca-Berzal et al. 2015, Palmeiro-Roldán et al. 2014).

Por otro lado, el reposicionamiento terapéutico, basado en el empleo en nuevas indicaciones terapéuticas de fármacos ya aprobados, ha demostrado su éxito con casos como la paromomicina (antibiótico), anfotericina B (antifúngico) y miltefosina y nifurtimox (anticancerígenos). Esta estrategia permite la reducción de costes y tiempos en el desarrollo de dichos fármacos, ya que los estudios farmacocinéticos y de seguridad se encuentran ya disponibles (Alcântara et al. 2018, Charlton et al. 2018).

Las terapias en combinación han sido exploradas en el ámbito de las enfermedades infecciosas como medida para aumentar la eficacia y reducir los efectos adversos de los fármacos empleados y minimizar el desarrollo de resistencias por parte de los agentes etiológicos (Alcântara et al. 2018). Un claro ejemplo de los potenciales beneficios de este abordaje terapéutico es el observado en estudios clínicos para el tratamiento de la leishmaniasis visceral empleando anfotericina B en combinación con miltefosina, en los que se demostró una mejor tolerancia y perfil de seguridad de estos fármacos con tasas de curación del 94% (Alcântara et al. 2018). Otro claro ejemplo de terapia en combinación es la explorada en el ensayo STOP-CHAGAS, empleando benznidazol y posaconazol, sin embargo, se demostró la no superioridad de la combinación respecto a la monoterapia (Morillo et al. 2017). Como se ha comentado anteriormente, en este proyecto se ha explorado con éxito en ensayos *in vitro* la combinación

de uno de los compuestos de la librería de Calibr con benznidazol frente a amastigotes de *T. cruzi*.

En lo que respecta al *screening de novo*, se han establecido multitud de colaboraciones entre empresas farmacéuticas, instituciones como DNDi o la Wellcome Trust, y la academia, con el objetivo de aunar los recursos y las fortalezas de cada sector para disminuir el coste y el tiempo necesario para la búsqueda de fármacos para enfermedades desatendidas como son el Chagas y la leishmaniasis, siendo la presente Tesis Doctoral un nuevo ejemplo de ello (Alcântara et al. 2018, Ballell et al. 2016).

A lo largo de los últimos años se han realizado diversas campañas de *screening* en busca de nuevos fármacos frente a *L. donovani* y *T. cruzi*, tanto a nivel académico como en el ámbito de la industria farmacéutica (Martín, Cantizani, and Peña 2018, Chatelain and Ioset 2018).

En el contexto del *screening*, existen a su vez dos principales estrategias: *target-based* y fenotípica. Generalmente, los ensayos *target-based* son menos aplicados tanto frente a *Leishmania* como frente a *T. cruzi*, debido principalmente a la escasez de dianas validadas y peor correlación de los resultados obtenidos con los resultados clínicos. Normalmente, los puntos de partida para el descubrimiento de fármacos *de novo* mediante *screening* son los ensayos celulares fenotípicos *in vitro* (Martín, Cantizani, and Peña 2018, Chatelain and Ioset 2018, Alcântara et al. 2018, Fonseca-Berzal, Arán, et al. 2018).

Desde el punto de vista de la forma parasitaria que empleen, se han descrito diferentes tipos de *screening*. En el caso de *T. cruzi*, la mayor parte de campañas de *screening* emplean amastigotes intracelulares (De Rycker et al. 2016, Neitz et al. 2015, Alonso-Padilla et al. 2015), sin embargo, también se ha descrito el uso de epimastigotes en ensayo primario por su facilidad de cultivo (Fonseca-Berzal et al. 2014, Fonseca-Berzal, Ibanez-Escribano, et al. 2018, Fonseca-Berzal, Arán, et al. 2018, Chatelain and Ioset 2018).

En el caso de *Leishmania*, se han empleado promastigotes (Siqueira-Neto et al. 2010, Sharlow et al. 2009) y amastigotes axénicos o intracelulares (Khare et al. 2016, Nuhs et al. 2015, Peña et al. 2015, Siqueira-Neto et al. 2012). Las dos campañas de *screening* frente a *Leishmania donovani* de mayor envergadura fueron las realizadas por GSK (1.8 millones de compuestos) y Novartis (2.9 millones de compuestos), ambas empleando amastigotes axénicos para el *screening* primario y una posterior confirmación mediante el uso de amastigotes intracelulares (Peña et al. 2015, Khare et al. 2016). El ensayo que emplea macrófagos infectados con

amastigotes es el ensayo de referencia en la búsqueda de nuevos fármacos frente a este parásito (Alcântara et al. 2018).

En el contexto de esta Tesis se ha confirmado la identificación de compuestos previamente detectados en los mencionados screening de Novartis y GSK, validando la cascada de progresión empleada.

En el campo del *screening de novo* para la búsqueda de nuevos fármacos frente a la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, esta Tesis aporta una cascada de progresión validada, mediante la cual se han identificado un total de 29 compuestos frente a *L. donovani* y 78 estructuras frente a *T. cruzi*, de los cuales uno muestra actividad cida frente a amastigotes en el ensayo de *Rate of Kill*.



## 5. CONCLUSIONES



1. Las cascadas de progresión empleadas para la identificación de nuevas moléculas activas frente a los parásitos *Leishmania donovani* y *Trypanosoma cruzi* han sido validadas mediante la identificación de nueve compuestos ya conocidos por su actividad frente a estos parásitos.
2. Mediante ensayos *in vitro* se han identificado varios compuestos novedosos para el tratamiento de la leishmaniasis visceral. Considerando el criterio de actividad  $pIC_{50}$  AmMac > 5, y como criterio de toxicidad  $pIC_{50}$  Mac o HepG2 < 5, se han identificado un total de 29 compuestos frente a *L. donovani*, de los cuales 25 se agrupan en 8 familias y 4 son *singletons*.
3. Mediante ensayos *in vitro* se han identificado varios compuestos novedosos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Considerando como criterio de actividad  $pIC_{50}$  AmCel > 5 y como criterio de toxicidad  $pIC_{50}$  H9c2 o HepG2 < 5, se han identificado un total de 78 compuestos frente a *T. cruzi*, de los cuales 68 se agrupan en 9 familias y 10 son *singletons*.
4. El compuesto TCOLFS059386 demuestra actividad cida frente a los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* en el ensayo *Rate of Kill*, presentando la misma concentración mínima cida que el compuesto de referencia, benznidazol, aunque con un mejor perfil de toxicidad y una mayor velocidad de acción.
5. El compuesto TCOLFS008553 en combinación con benznidazol demuestra superioridad en comparación con la monoterapia en el ensayo *Rate of Kill* frente a amastigotes de *T. cruzi*, permitiendo disminuir hasta 10 veces la concentración de benznidazol en presencia de 2.5  $\mu$ M del compuesto novedoso y logrando el mismo efecto frente a los amastigotes sin presentar toxicidad frente a las células hospedadoras.



## 6. BIBLIOGRAFÍA



- Albonico, M., B. Levecke, P. T. LoVerde, A. Montresor, R. Prichard, J. Vercruyssen, and J. P. Webster. 2015. "Monitoring the efficacy of drugs for neglected tropical diseases controlled by preventive chemotherapy." *J Glob Antimicrob Resist* 3 (4):229-236. doi: 10.1016/j.jgar.2015.08.004.
- Alcântara, L. M., T. C. S. Ferreira, F. R. Gadelha, and D. C. Miguel. 2018. "Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis." *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 8 (3):430-439. doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.09.006.
- Alonso-Padilla, J., I. Cotillo, J. L. Presa, J. Cantizani, I. Pena, A. I. Bardera, J. J. Martin, and A. Rodriguez. 2015. "Automated high-content assay for compounds selectively toxic to *Trypanosoma cruzi* in a myoblastic cell line." *PLoS Negl Trop Dis* 9 (1):e0003493. doi: 10.1371/journal.pntd.0003493.
- Alonso-Padilla, J., M. Gallego, A. G. Schijman, and J. Gascon. 2017. "Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies." *Expert Rev Mol Diagn.* doi: 10.1080/14737159.2017.1338566.
- Alpern, J. D., R. Lopez-Velez, and W. M. Stauffer. 2017. "Access to benznidazole for Chagas disease in the United States-Cautious optimism?" *PLoS Negl Trop Dis* 11 (9):e0005794. doi: 10.1371/journal.pntd.0005794.
- Alvar, J., I. D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer, and W. H. O. Leishmaniasis Control Team. 2012. "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." *PLoS One* 7 (5):e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
- Alvar, Jorge, and Byron Arana. 2017. "I. Appraisal of Leishmaniasis Chemotherapy, Current Status and Pipeline Strategies Chapter 1. Leishmaniasis, Impact and Therapeutic Needs." 1-23. doi: 10.1039/9781788010177-00001.
- Alvar, Jorge, Simon Croft, and Piero Olliaro. 2006. "Chemotherapy in the Treatment and Control of Leishmaniasis." 61:223-274. doi: 10.1016/s0065-308x(05)61006-8.
- Andrade-Narvaez, F. J., E. N. Loría-Cervera, E. I. Sosa-Bibiano, and N. R. Van Wynsberghe. 2016. "Asymptomatic infection with American cutaneous leishmaniasis: epidemiological and immunological studies." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 111 (10):599-604. doi: 10.1590/0074-02760160138.
- Annang, F., G. Pérez-Moreno, R. García-Hernández, C. Cordon-Obras, J. Martín, J. R. Tormo, L. Rodríguez, N. de Pedro, V. Gómez-Pérez, M. Valente, F. Reyes, O. Genilloud, F. Vicente, S. Castanys, L. M. Ruiz-Pérez, M. Navarro, F. Gamarro, and D. González-Pacanowska. 2015. "High-throughput screening platform for natural product-based drug discovery against 3 neglected tropical diseases: human African trypanosomiasis, leishmaniasis, and Chagas disease." *J Biomol Screen* 20 (1):82-91. doi: 10.1177/1087057114555846.
- Baell, Jonathan B., and Georgina A. Holloway. 2010. "New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays." *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (7):2719-2740. doi: 10.1021/jm901137j.

- Bahia, M. T., I. M. de Andrade, T. A. Martins, A. F. do Nascimento, F. Diniz Lde, I. S. Caldas, A. Talvani, B. B. Trunz, E. Torreele, and I. Ribeiro. 2012. "Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease." *PLoS Negl Trop Dis* 6 (11):e1870. doi: 10.1371/journal.pntd.0001870.
- Bahia, M. T., A. F. Nascimento, A. L. Mazzeti, L. F. Marques, K. R. Goncalves, L. W. Mota, F. Diniz Lde, I. S. Caldas, A. Talvani, D. M. Shackelford, M. Koltun, J. Saunders, K. L. White, I. Scandale, S. A. Charman, and E. Chatelain. 2014. "Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease." *Antimicrob Agents Chemother* 58 (8):4362-70. doi: 10.1128/AAC.02754-13.
- Bakowski, Malina A, Roohollah Kazem Shiroodi, Renhe Liu, Jason Olejniczak, Baiyuan Yang, Kerstin Gagaring, Hui Guo, Pamela M White, Laura Chappell, and Alain Debec. 2019. "Discovery of short-course antiwolbachial quinazolines for elimination of filarial worm infections." *Science translational medicine* 11 (491):eaav3523.
- Ballell, L., M. Strange, N. Cammack, A. H. Fairlamb, and L. Borysiewicz. 2016. "Open Lab as a source of hits and leads against tuberculosis, malaria and kinetoplastid diseases." *Nat Rev Drug Discov* 15 (4):292. doi: 10.1038/nrd.2016.51.
- Barrett, M. P., and S. L. Croft. 2012. "Management of trypanosomiasis and leishmaniasis." *Br Med Bull* 104:175-96. doi: 10.1093/bmb/lds031.
- Bates, P. A. 2015. "Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control." *Parasites and Vectors* 8 (1).
- Bayliss, M. K., J. Butler, P. L. Feldman, D. V. Green, P. D. Leeson, M. R. Palovich, and A. J. Taylor. 2016. "Quality guidelines for oral drug candidates: dose, solubility and lipophilicity." *Drug Discov Today* 21 (10):1719-1727. doi: 10.1016/j.drudis.2016.07.007.
- Bermúdez, J., C. Davies, A. Simonazzi, J. P. Real, and S. Palma. 2016. "Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease." *Acta Trop* 156:1-16. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.12.017.
- Bern, C. 2015. "Chagas' Disease." *N Engl J Med* 373 (5):456-66. doi: 10.1056/NEJMra1410150.
- Bern, C. 2017. "A New Epoch in Antitrypanosomal Treatment for Chagas Disease." *J Am Coll Cardiol* 69 (8):948-950. doi: 10.1016/j.jacc.2016.12.016.
- Bettiol, E., M. Samanovic, A. S. Murkin, J. Raper, F. Buckner, and A. Rodriguez. 2009. "Identification of three classes of heteroaromatic compounds with activity against intracellular *Trypanosoma cruzi* by chemical library screening." *PLoS Negl Trop Dis* 3 (2):e384. doi: 10.1371/journal.pntd.0000384.
- Boscardin, S. B., A. C. Torrecilhas, R. Manarin, S. Revelli, E. G. Rey, R. R. Tonelli, and A. M. Silber. 2010. "Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies." *J Cell Mol Med* 14 (6B):1373-84. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01007.x.
- Buckner, Frederick S, CL Verlinde, Anne C La Flamme, and Wesley C Van Voorhis. 1996. "Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40 (11):2592-2597.

- Calibr. 2017. Accessed 25 June 2017. [www.calibr.org](http://www.calibr.org).
- Castell, José V, Ramiro Jover, Celia P Martínez-Jiménez, and María José Gómez-Lechón. 2006. "Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies." *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 2 (2):183-212.
- Castillo, E. 2010. "The kinetoplastid chemotherapy revisited: current drugs, recent advances and future perspectives." *Current Medicinal Chemistry* 17 (33).
- Chappuis, F., S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J. Alvar, and M. Boelaert. 2007. "Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?" *Nat Rev Microbiol* 5 (11):873-82. doi: 10.1038/nrmicro1748.
- Charlton, R. L., B. Rossi-Bergmann, P. W. Denny, and P. G. Steel. 2018. "Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the-state-of-the-art." *Parasitology* 145 (2):219-236. doi: 10.1017/s0031182017000993.
- Chatelain, E. 2015. "Chagas disease drug discovery: toward a new era." *J Biomol Screen* 20 (1):22-35. doi: 10.1177/1087057114550585.
- Chatelain, E. 2017. "Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel?" *Comput Struct Biotechnol J* 15:98-103. doi: 10.1016/j.csbj.2016.12.002.
- Chatelain, E., and J. R. Ioset. 2018. "Phenotypic screening approaches for Chagas disease drug discovery." *Expert Opin Drug Discov* 13 (2):141-153. doi: 10.1080/17460441.2018.1417380.
- Coma, Isabel, Jesus Herranz, and Julio Martín. 2009. "Statistics and Decision Making in High-Throughput Screening." In *High Throughput Screening: Methods and Protocols, Second Edition*, edited by William P. Janzen and Paul Bernasconi, 69-106. Totowa, NJ: Humana Press.
- Cox, F. E. G. Fe. 2002. "History of human parasitology." *Clinical Microbiology Reviews* 15 (4):595-612.
- Custodio Leite, T. O. 2019. "Developments on treatment of Chagas disease - from discovery to current times." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23 (6):2576-2586. doi: 10.26355/eurrev\_201903\_17407.
- Dahlin, J. L. 2014. "The essential roles of chemistry in high-throughput screening triage." *Future Medicinal Chemistry* 6 (11).
- De Rycker, M., I. Hallyburton, J. Thomas, L. Campbell, S. Wyllie, D. Joshi, S. Cameron, I. H. Gilbert, P. G. Wyatt, J. A. Frearson, A. H. Fairlamb, and D. W. Gray. 2013. "Comparison of a high-throughput high-content intracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay." *Antimicrob Agents Chemother* 57 (7):2913-22. doi: 10.1128/aac.02398-12.
- De Rycker, M., J. Thomas, J. Riley, S. J. Brough, T. J. Miles, and D. W. Gray. 2016. "Identification of Trypanocidal Activity for Known Clinical Compounds Using a New *Trypanosoma cruzi* Hit-Discovery Screening Cascade." *PLoS Negl Trop Dis* 10 (4):e0004584. doi: 10.1371/journal.pntd.0004584.
- de Souza, W., T. M. de Carvalho, and E. S. Barrias. 2010. "Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction." *Int J Cell Biol* 2010. doi: 10.1155/2010/295394.
- Deeks, E. D. 2019. "Fexinidazole: First Global Approval." *Drugs*. doi: 10.1007/s40265-019-1051-6.

- DiMasi, J. A., H. G. Grabowski, and R. W. Hansen. 2016. "Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs." *J Health Econ* 47:20-33. doi: 10.1016/j.jhealeco.2016.01.012.
- DNDi. 2018. Accessed 17/04/2018. <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/fexinidazole-chagas/>.
- Don, R., and J. R. Ioset. 2014. "Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections." *Parasitology* 141 (1):140-6. doi: 10.1017/S003118201300142X.
- Dorlo, T. P., M. Balasegaram, J. H. Beijnen, and P. J. de Vries. 2012. "Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis." *J Antimicrob Chemother* 67 (11):2576-97. doi: 10.1093/jac/dks275.
- Dumonteil, E., and C. Herrera. 2017. "Ten years of Chagas disease research: Looking back to achievements, looking ahead to challenges." *PLoS Negl Trop Dis* 11 (4):e0005422. doi: 10.1371/journal.pntd.0005422.
- Dutta, A. K. 2008. "Pursuit of medical knowledge: Charles Donovan (1863-1951) on kala-azar in India." *J Med Biogr* 16 (2):72-6. doi: 10.1258/jmb.2007.007004.
- Echeverria, L. E., and C. A. Morillo. 2019. "American Trypanosomiasis (Chagas Disease)." *Infect Dis Clin North Am* 33 (1):119-134. doi: 10.1016/j.idc.2018.10.015.
- Ejazi, S. A., and N. Ali. 2013. "Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects." *Expert Rev Anti Infect Ther* 11 (1):79-98. doi: 10.1586/eri.12.148.
- Engels, D., and L. Savioli. 2006. "Reconsidering the underestimated burden caused by neglected tropical diseases." *Trends Parasitol* 22 (8):363-6. doi: 10.1016/j.pt.2006.06.004.
- Fonseca-Berzal, C., V. J. Arán, J. A. Escario, and A. Gómez-Barrio. 2018. "Experimental models in Chagas disease: a review of the methodologies applied for screening compounds against *Trypanosoma cruzi*." *Parasitology Research* 117 (11):3367-3380. doi: 10.1007/s00436-018-6084-3.
- Fonseca-Berzal, C., A. Ibanez-Escribano, N. Vela, J. Cumella, J. J. Nogal-Ruiz, J. A. Escario, P. B. da Silva, M. M. Batista, M. N. C. Soeiro, S. Sifontes-Rodriguez, A. Meneses-Marcel, A. Gomez-Barrio, and V. J. Aran. 2018. "Antichagasic, Leishmanicidal, and Trichomonacidal Activity of 2-Benzyl-5-nitroindazole-Derived Amines." *ChemMedChem* 13 (12):1246-1259. doi: 10.1002/cmdc.201800084.
- Fonseca-Berzal, C., R. Palmeiro-Roldán, J. A. Escario, S. Torrado, V. J. Arán, S. Torrado-Santiago, and A. Gómez-Barrio. 2015. "Novel solid dispersions of benznidazole: preparation, dissolution profile and biological evaluation as alternative antichagasic drug delivery system." *Exp Parasitol* 149:84-91. doi: 10.1016/j.exppara.2015.01.002.
- Fonseca-Berzal, C., F. A. Rojas Ruiz, J. A. Escario, V. V. Kouznetsov, and A. Gomez-Barrio. 2014. "In vitro phenotypic screening of 7-chloro-4-amino(oxy)quinoline derivatives as putative anti-*Trypanosoma cruzi* agents." *Bioorg Med Chem Lett* 24 (4):1209-13. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.12.071.

- Francisco, A. F., M. D. Lewis, S. Jayawardhana, M. C. Taylor, E. Chatelain, and J. M. Kelly. 2015. "Limited Ability of Posaconazole To Cure both Acute and Chronic *Trypanosoma cruzi* Infections Revealed by Highly Sensitive In Vivo Imaging." *Antimicrob Agents Chemother* 59 (8):4653-61. doi: 10.1128/AAC.00520-15.
- Gebre-Hiwot, A, G Tadesse, SL Croft, and D Frommel. 1992. "An in vitro model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1." *Acta tropica* 51 (3-4):237-245.
- Georgiadou, S. P., K. P. Makaritsis, and G. N. Dalekos. 2015. "Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment." *J Transl Int Med* 3 (2):43-50. doi: 10.1515/jtim-2015-0002.
- Goldenberg, S., and A. R. Avila. 2011. "Aspects of *Trypanosoma cruzi* stage differentiation." *Adv Parasitol* 75:285-305. doi: 10.1016/B978-0-12-385863-4.00013-7.
- Guarner, J. 2019. "Chagas disease as example of a reemerging parasite." *Semin Diagn Pathol*. doi: 10.1053/j.semmp.2019.04.008.
- Hall, B. S., C. Bot, and S. R. Wilkinson. 2011. "Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites." *J Biol Chem* 286 (15):13088-95. doi: 10.1074/jbc.M111.230847.
- Hashiguchi, Y., E. L. Gomez, H. Kato, L. R. Martini, L. N. Velez, and H. Uezato. 2016. "Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review." *Trop Med Health* 44:2. doi: 10.1186/s41182-016-0002-0.
- Hofstraat, K., and W. H. van Brakel. 2016. "Social stigma towards neglected tropical diseases: a systematic review." *Int Health* 8 Suppl 1:i53-70. doi: 10.1093/inthealth/ihv071.
- Horvath, P., N. Aulner, M. Bickle, A. M. Davies, E. D. Nery, D. Ebner, M. C. Montoya, P. Ostling, V. Pietiainen, L. S. Price, S. L. Shorte, G. Turcatti, C. von Schantz, and N. O. Carragher. 2016. "Screening out irrelevant cell-based models of disease." *Nat Rev Drug Discov* 15 (11):751-769. doi: 10.1038/nrd.2016.175.
- Hotez, P. J. 2007. "Control of neglected tropical diseases." *New England Journal of Medicine* 357 (10).
- Hotez, P. J., M. Alvarado, M. G. Basáñez, I. Bolliger, R. Bourne, M. Boussinesq, S. J. Brooker, A. S. Brown, G. Buckle, C. M. Budke, H. Carabin, L. E. Coffeng, E. M. Fevre, T. Furst, Y. A. Halasa, R. Jasrasaria, N. E. Johns, J. Keiser, C. H. King, R. Lozano, M. E. Murdoch, S. O'Hanlon, S. D. Pion, R. L. Pullan, K. D. Ramaiah, T. Roberts, D. S. Shepard, J. L. Smith, W. A. Stolk, E. A. Undurraga, J. Utzinger, M. Wang, C. J. Murray, and M. Naghavi. 2014. "The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases." *PLoS Negl Trop Dis* 8 (7):e2865. doi: 10.1371/journal.pntd.0002865.
- Hotez, P. J., B. Pecoul, S. Rijal, C. Boehme, S. Aksoy, M. Malecela, R. Tapia-Conyer, and J. C. Reeder. 2016. "Eliminating the Neglected Tropical Diseases: Translational Science and New Technologies." *PLoS Negl Trop Dis* 10 (3):e0003895. doi: 10.1371/journal.pntd.0003895.

- Houweling, T. A., H. E. Karim-Kos, M. C. Kulik, W. A. Stolk, J. A. Haagsma, E. J. Lenk, J. H. Richardus, and S. J. de Vlas. 2016. "Socioeconomic Inequalities in Neglected Tropical Diseases: A Systematic Review." *PLoS Negl Trop Dis* 10 (5):e0004546. doi: 10.1371/journal.pntd.0004546.
- Hughes, J. P., S. Rees, S. B. Kalindjian, and K. L. Philpott. 2011. "Principles of early drug discovery." *Br J Pharmacol* 162 (6):1239-49. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.
- Kan, S., W. M. Cheung, Y. Zhou, and W. S. Ho. 2014. "Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by tanshinone IIA in HepG2 human hepatoma cells." *Planta Med* 80 (1):70-6. doi: 10.1055/s-0033-1360126.
- Kaur, G., and B. Rajput. 2014. "Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B, and pentamidine resistance in leishmania." *J Parasitol Res* 2014:726328. doi: 10.1155/2014/726328.
- Keenan, M., and J. H. Chaplin. 2015. "A new era for chagas disease drug discovery?" *Prog Med Chem* 54:185-230. doi: 10.1016/bs.pmch.2014.12.001.
- Kevric, Ines, Mark A. Cappel, and James H. Keeling. 2015. "New World and Old World Leishmania Infections." *Dermatologic Clinics* 33 (3):579-593. doi: 10.1016/j.det.2015.03.018.
- Khare, S., A. S. Nagle, A. Biggart, Y. H. Lai, F. Liang, L. C. Davis, S. W. Barnes, C. J. Mathison, E. Myburgh, M. Y. Gao, J. R. Gillespie, X. Liu, J. L. Tan, M. Stinson, I. C. Rivera, J. Ballard, V. Yeh, T. Groessl, G. Federe, H. X. Koh, J. D. Venable, B. Bursulaya, M. Shapiro, P. K. Mishra, G. Spraggon, A. Brock, J. C. Mottram, F. S. Buckner, S. P. Rao, B. G. Wen, J. R. Walker, T. Tuntland, V. Molteni, R. J. Glynn, and F. Supek. 2016. "Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness." *Nature* 537 (7619):229-233. doi: 10.1038/nature19339.
- Kratz, J. M., F. Garcia Bournissen, C. J. Forsyth, and S. Sosa-Estani. 2018. "Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease." *Expert Rev Clin Pharmacol* 11 (10):943-957. doi: 10.1080/17512433.2018.1509704.
- Love, M. S., F. C. Beasley, R. S. Jumani, T. M. Wright, A. K. Chatterjee, C. D. Huston, P. G. Schultz, and C. W. McNamara. 2017. "A high-throughput phenotypic screen identifies clofazimine as a potential treatment for cryptosporidiosis." *PLoS Negl Trop Dis* 11 (2):e0005373. doi: 10.1371/journal.pntd.0005373.
- Macarrón, Ricardo, and Robert P. Hertzberg. 2009. "Design and Implementation of High-Throughput Screening Assays." In *High Throughput Screening: Methods and Protocols, Second Edition*, edited by William P. Janzen and Paul Bernasconi, 1-32. Totowa, NJ: Humana Press.
- MacLean, L. M.; Thomas, J.; Lewis, M.; Cutillo Torrejon, I.; Gray, D.; De Rycker, M. 2018. "Development of Trypanosoma cruzi in vitro assays to identify compounds suitable for progression in Chagas' disease drug discovery." *PLOS Neglected Tropical Diseases*.
- Martín, Julio, Juan Cantizani, and Imanol Peña. 2018. "Chapter 5 The Pursuit of Novel Anti-leishmanial Agents by High-throughput Screening (HTS) of Chemical Libraries." In *Drug Discovery for Leishmaniasis*, 77-100. The Royal Society of Chemistry.

- Mathers, C. D., M. Ezzati, and A. D. Lopez. 2007. "Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework." *PLoS Negl Trop Dis* 1 (2):e114. doi: 10.1371/journal.pntd.0000114.
- McCall, L. I., and J. H. McKerrow. 2014. "Determinants of disease phenotype in trypanosomatid parasites." *Trends Parasitol* 30 (7):342-9. doi: 10.1016/j.pt.2014.05.001.
- Means, A. R., J. Jacobson, A. W. Mosher, and J. L. Walson. 2016. "Integrated Healthcare Delivery: A Qualitative Research Approach to Identifying and Harmonizing Perspectives of Integrated Neglected Tropical Disease Programs." *PLoS Negl Trop Dis* 10 (10):e0005085. doi: 10.1371/journal.pntd.0005085.
- Merritt, C., L. E. Silva, A. L. Tanner, K. Stuart, and M. P. Pollastri. 2014. "Kinases as druggable targets in trypanosomatid protozoan parasites." *Chem Rev* 114 (22):11280-304. doi: 10.1021/cr500197d.
- Mersch-Sundermann, V., S. Knasmüller, X. J. Wu, F. Darroudi, and F. Kassie. 2004. "Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents." *Toxicology* 198 (1-3):329-40. doi: 10.1016/j.tox.2004.02.009.
- Molina, I., J. Gómez i Prat, F. Salvador, B. Treviño, E. Sulleiro, N. Serre, D. Pou, S. Roure, J. Cabezos, L. Valerio, A. Blanco-Grau, A. Sánchez-Montalvá, X. Vidal, and A. Pahissa. 2014. "Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease." *N Engl J Med* 370 (20):1899-908. doi: 10.1056/NEJMoa1313122.
- Mondal, S., P. Bhattacharya, and N. Ali. 2010. "Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis." *Expert Rev Anti Infect Ther* 8 (8):919-44. doi: 10.1586/eri.10.78.
- Moraes, C. B., M. A. Giardini, H. Kim, C. H. Franco, A. M. Araujo-Junior, S. Schenkman, E. Chatelain, and L. H. Freitas-Junior. 2014. "Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development." *Sci Rep* 4:4703. doi: 10.1038/srep04703.
- Morgan, P., P. H. Van Der Graaf, J. Arrowsmith, D. E. Feltner, K. S. Drummond, C. D. Wegner, and S. D. Street. 2012. "Can the flow of medicines be improved? Fundamental pharmacokinetic and pharmacological principles toward improving Phase II survival." *Drug Discov Today* 17 (9-10):419-24. doi: 10.1016/j.drudis.2011.12.020.
- Morillo, C. A., J. A. Marin-Neto, A. Avezum, S. Sosa-Estani, A. Rassi, Jr., F. Rosas, E. Villena, R. Quiroz, R. Bonilla, C. Britto, F. Guhl, E. Velazquez, L. Bonilla, B. Meeks, P. Rao-Melacini, J. Pogue, A. Mattos, J. Lazdins, A. Rassi, S. J. Connolly, S. Yusuf, and Benefit Investigators. 2015. "Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy." *N Engl J Med* 373 (14):1295-306. doi: 10.1056/NEJMoa1507574.
- Morillo, Carlos A., Hetty Waskin, Sergio Sosa-Estani, Maria del Carmen Bangher, Carlos Cuneo, Rodolfo Milesi, Marcelo Mallagray, Werner Apt, Juan Beloscar, Joaquim Gascon, Israel Molina, Luis E. Echeverria, Hugo Colombo, Jose Antonio Perez-Molina, Fernando Wyss, Brandi Meeks, Laura R. Bonilla, Peggy Gao, Bo Wei, Michael McCarthy, Salim Yusuf, Carlos Morillo, Sergio Sosa-Estani, Hetty Waskin, Brandi Meeks, Salim Yusuf, Rafael Diaz, Harry Acquatella, Julio Lazzari, Robin

- Roberts, Mahmoud Traina, Brandi Meeks, Laura R. Bonilla, Peggy Gao, Amanda Taylor, Iris Holadyk-Gris, Lindsey Whalen, M. C. Bangher, M. A. Romero, N. Prado, Y. Hernández, M. Fernandez, A. Riarte, K. Scollo, C. Lopez-Albizu, C. A. Cuneo, N. C. Gutiérrez, R. R. Milesi, M. A. Berli, M. H. Mallagray, N. E. Cáceres, J. S. Beloscar, J. M. Petrucci, H. Colombo, M. Dellatorre, Aldo Prado, W. Apt, I. Zulantay, L. E. Echeverría, D. Isaza, E. Reyes, F. S. Wyss, A. Figueroa, I. Guzmán Melgar, E. Rodríguez, J. Gascon, E. Aldasoro, E. J. Posada, N. Serret, I. Molina, A. Sánchez-Montalvá, J. A. Perez-Molina, R. López-Vélez, and P. A. Reyes-López. 2017. "Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. Cruzi Carriers." *Journal of the American College of Cardiology* 69 (8):939-947. doi: 10.1016/j.jacc.2016.12.023.
- Neitz, R. J., S. Chen, F. Supek, V. Yeh, D. Kellar, J. Gut, C. Bryant, A. Gallardo-Godoy, V. Molteni, S. L. Roach, S. Khare, M. Stinson, A. K. Chatterjee, S. Robertson, A. R. Renslo, M. Arkin, R. Glynne, J. McKerrow, and J. L. Siqueira-Neto. 2015. "Lead identification to clinical candidate selection: drugs for Chagas disease." *J Biomol Screen* 20 (1):101-11. doi: 10.1177/1087057114553103.
- Nicolaou, K. C. 2014. "Advancing the Drug Discovery and Development Process." *Angewandte Chemie International Edition* 53 (35):9128-9140. doi: 10.1002/anie.201404761.
- No, J. H. 2016. "Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries." *Acta Trop* 155:113-23. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.12.016.
- Nuhs, A., M. De Rycker, S. Manthri, E. Comer, C. A. Scherer, S. L. Schreiber, J. R. Ioset, and D. W. Gray. 2015. "Development and Validation of a Novel Leishmania donovani Screening Cascade for High-Throughput Screening Using a Novel Axenic Assay with High Predictivity of Leishmanicidal Intracellular Activity." *PLoS Negl Trop Dis* 9 (9):e0004094. doi: 10.1371/journal.pntd.0004094.
- Ordóñez-Gutiérrez, L., R. Espada-Fernandez, M. A. Dea-Ayuela, J. J. Torrado, F. Bolás-Fernandez, and J. M. Alunda. 2007. "In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of Leishmania infantum." *Int J Antimicrob Agents* 30 (4):325-9. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.05.013.
- Palmeiro-Roldán, R., C. Fonseca-Berzal, A. Gómez-Barrio, V. J. Arán, J. A. Escario, S. Torrado-Durán, and S. Torrado-Santiago. 2014. "Development of novel benznidazole formulations: physicochemical characterization and in vivo evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease." *Int J Pharm* 472 (1-2):110-7. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.06.015.
- Pandey, K., V. Ravidas, N. A. Siddiqui, S. K. Sinha, R. B. Verma, T. P. Singh, A. C. Dhariwal, R. K. Das Gupta, and P. Das. 2016. "Pharmacovigilance of Miltefosine in Treatment of Visceral Leishmaniasis in Endemic Areas of Bihar, India." *Am J Trop Med Hyg* 95 (5):1100-1105. doi: 10.4269/ajtmh.16-0242.
- Paul, S. M., D. S. Mytelka, C. T. Dunwiddie, C. C. Persinger, B. H. Munos, S. R. Lindborg, and A. L. Schacht. 2010. "How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge." *Nat Rev Drug Discov* 9 (3):203-14. doi: 10.1038/nrd3078.
- Peña, I., M. P. Manzano, J. Cantizani, A. Kessler, J. Alonso-Padilla, A. I. Bardera, E. Álvarez, G. Colmenarejo, I. Cotillo, I. Roquero, F. de Dios-Antón, V. Barroso, A. Rodriguez, D. W. Gray, M. Navarro, V.

- Kumar, A. Sherstnev, D. H. Drewry, J. R. Brown, J. M. Fiandor, and J. J. Martin. 2015. "New compound sets identified from high throughput phenotypic screening against three kinetoplastid parasites: an open resource." *Sci Rep* 5:8771. doi: 10.1038/srep08771.
- Pérez-Molina, Jose A., Angela Martínez Pérez, Francesca F. Norman, Begoña Monge-Maillo, and Rogelio López-Vélez. 2015. "Old and new challenges in Chagas disease." *The Lancet Infectious Diseases* 15 (11):1347-1356. doi: 10.1016/s1473-3099(15)00243-1.
- Pérez-Victoria, F. J., F. Gamarro, M. Ouellette, and S. Castanys. 2003. "Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance." *J Biol Chem* 278 (50):49965-71. doi: 10.1074/jbc.M308352200.
- Pérez-Victoria, F. J., M. P. Sánchez-Cañete, S. Castanys, and F. Gamarro. 2006. "Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites." *J Biol Chem* 281 (33):23766-75. doi: 10.1074/jbc.M605214200.
- Pitasse-Santos, Paulo, Vitor Sueth-Santiago, and Marco Lima. 2017. "1,2,4- and 1,3,4-Oxadiazoles as Scaffolds in the Development of Antiparasitic Agents." *Journal of the Brazilian Chemical Society*. doi: 10.21577/0103-5053.20170208.
- Qiu, G. H., X. Xie, F. Xu, X. Shi, Y. Wang, and L. Deng. 2015. "Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B." *Cytotechnology* 67 (1):1-12. doi: 10.1007/s10616-014-9761-9.
- Ramírez, J. C., C. I. Cura, O. da Cruz Moreira, E. Lages-Silva, N. Juiz, E. Velázquez, J. D. Ramírez, A. Alberti, P. Pavia, M. D. Flores-Chávez, A. Muñoz-Calderón, D. Pérez-Morales, J. Santalla, P. Marcos da Matta Guedes, J. Peneau, P. Marcet, C. Padilla, D. Cruz-Robles, E. Valencia, G. E. Crisante, G. Greif, I. Zulantay, J. A. Costales, M. Alvarez-Martínez, N. E. Martínez, R. Villarroel, S. Villarroel, Z. Sanchez, M. Bisio, R. Parrado, L. Maria da Cunha Galvao, A. C. Jácome da Câmara, B. Espinoza, B. Alarcón de Noya, C. Puerta, A. Riarte, P. Diosque, S. Sosa-Estani, F. Guhl, I. Ribeiro, C. Aznar, C. Britto, Z. E. Yadon, and A. G. Schijman. 2015. "Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients." *J Mol Diagn* 17 (5):605-15. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.04.010.
- Rassi, A., Jr., A. Rassi, and J. A. Marin-Neto. 2010. "Chagas disease." *Lancet* 375 (9723):1388-402. doi: 10.1016/s0140-6736(10)60061-x.
- Rassi Jr, Anis, José Antonio Marin Neto, and Anis Rassi. 2017. "Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 112 (3):224-235. doi: 10.1590/0074-02760160334.
- Ready, Paul. 2014. "Epidemiology of visceral leishmaniasis." *Clinical Epidemiology*:147. doi: 10.2147/clep.s44267.
- Rodrigues, Vasco, Anabela Cordeiro-da-Silva, Mireille Laforge, Ricardo Silvestre, and Jérôme Estaquier. 2016. "Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection." *Parasites & Vectors* 9 (1). doi: 10.1186/s13071-016-1412-x.

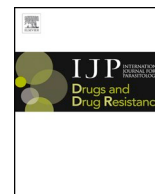
- Rodríguez, J. B., B. N. Falcone, and S. H. Szajnman. 2016. "Detection and treatment of *Trypanosoma cruzi*: a patent review (2011-2015)." *Expert Opin Ther Pat* 26 (9):993-1015. doi: 10.1080/13543776.2016.1209487.
- Roquero, I., J. Cantizani, I. Cotillo, M. P. Manzano, A. Kessler, J. J. Martin, and C. W. McNamara. 2019. "Novel chemical starting points for drug discovery in leishmaniasis and Chagas disease." *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 10:58-68. doi: 10.1016/j.ijpddr.2019.05.002.
- Ruiz, H. K., D. R. Serrano, M. A. Dea-Ayuela, P. E. Bilbao-Ramos, F. Bolás-Fernandez, J. J. Torrado, and G. Molero. 2014. "New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and *Leishmania* spp." *Int J Pharm* 473 (1-2):148-57. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.07.004.
- Salam, M. A., D. Mondal, M. Kabir, A. R. Ekram, and R. Haque. 2010. "PCR for diagnosis and assessment of cure in kala-azar patients in Bangladesh." *Acta Trop* 113 (1):52-5. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.09.005.
- Séguin, O., and A. Descoteaux. 2016. "Leishmania, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite." *Cell Immunol* 309:1-6. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.08.004.
- Seifert, K., P. Escobar, and S. L. Croft. 2010. "In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent." *J Antimicrob Chemother* 65 (3):508-11. doi: 10.1093/jac/dkp500.
- Sharlow, E. R., D. Close, T. Shun, S. Leimgruber, R. Reed, G. Mustata, P. Wipf, J. Johnson, M. O'Neil, M. Groggl, A. J. Magill, and J. S. Lazo. 2009. "Identification of potent chemotypes targeting *Leishmania major* using a high-throughput, low-stringency, computationally enhanced, small molecule screen." *PLoS Negl Trop Dis* 3 (11):e540. doi: 10.1371/journal.pntd.0000540.
- Simpson, A. G., J. R. Stevens, and J. Lukes. 2006. "The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates." *Trends Parasitol* 22 (4):168-74. doi: 10.1016/j.pt.2006.02.006.
- Siqueira-Neto, J. L., S. Moon, J. Jang, G. Yang, C. Lee, H. K. Moon, E. Chatelain, A. Genovesio, J. Cechetto, and L. H. Freitas-Junior. 2012. "An image-based high-content screening assay for compounds targeting intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in human macrophages." *PLoS Negl Trop Dis* 6 (6):e1671. doi: 10.1371/journal.pntd.0001671.
- Siqueira-Neto, J. L., O. R. Song, H. Oh, J. H. Sohn, G. Yang, J. Nam, J. Jang, J. Cechetto, C. B. Lee, S. Moon, A. Genovesio, E. Chatelain, T. Christophe, and L. H. Freitas-Junior. 2010. "Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds." *PLoS Negl Trop Dis* 4 (5):e675. doi: 10.1371/journal.pntd.0000675.
- Smith, G. F. 2011. "Designing drugs to avoid toxicity." *Prog Med Chem* 50:1-47. doi: 10.1016/B978-0-12-381290-2.00001-X.
- Smits, H. L. 2009. "Prospects for the control of neglected tropical diseases by mass drug administration." *Expert Review of Anti-infective Therapy* 7 (1).

- Stuart, K., R. Brun, S. Croft, A. Fairlamb, R. E. Gurtler, J. McKerrow, S. Reed, and R. Tarleton. 2008. "Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases." *J Clin Invest* 118 (4):1301-10. doi: 10.1172/JCI33945.
- Sundar Shyam, S. 2005. "Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex agglutination test." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, The* 73 (2):269-71.
- TCOLF. 2010. "Tres Cantos Open Lab Foundation." Accessed 16 June 2017. <http://www.openlabfoundation.org/>.
- Tegazzini, D., R. Diaz, F. Aguilar, I. Pena, J. L. Presa, V. Yardley, J. J. Martin, J. M. Coteron, S. L. Croft, and J. Cantizani. 2016. "A Replicative In Vitro Assay for Drug Discovery against *Leishmania donovani*." *Antimicrob Agents Chemother* 60 (6):3524-32. doi: 10.1128/aac.01781-15.
- Teixeira, D. E., M. Benchimol, P. H. Crepaldi, and W. de Souza. 2012. "Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease." *PLoS Negl Trop Dis* 6 (8):e1749. doi: 10.1371/journal.pntd.0001749.
- Teixeira, Dirceu E., Marlene Benchimol, Juliany C. F. Rodrigues, Paulo H. Crepaldi, Paulo F. P. Pimenta, and Wanderley de Souza. 2013. "The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations." *PLoS Pathogens* 9 (10):e1003594. doi: 10.1371/journal.ppat.1003594.
- Thakare, R., A. Dasgupta, and S. Chopra. 2018. "An update on benzimidazole for the treatment of patients with Chagas disease." *Drugs Today (Barc)* 54 (1):15-23. doi: 10.1358/dot.2018.54.1.2753402.
- Trindade, M. A., L. L. Silva, L. M. Braz, V. S. Amato, B. Naafs, and M. N. Sotto. 2015. "Post-kala-azar dermal leishmaniasis and leprosy: case report and literature review." *BMC Infect Dis* 15:543. doi: 10.1186/s12879-015-1260-x.
- Ueno, N., and M. E. Wilson. 2012. "Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival." *Trends Parasitol* 28 (8):335-44. doi: 10.1016/j.pt.2012.05.002.
- Uniting-to-combat-NTDs. 2012. "The London Declaration." Accessed 14 June 2017. <http://unitingtocombatntds.org/resource/london-declaration>.
- Uniting-to-combat-NTDs. 2017. "Llegando a mil millones - quinto informe de progreso desde la Declaración de Londres sobre las NTD." Accessed 20/01/2019. <https://unitingtocombatntds.org/reports/5th-report/>.
- Urbina, J. A. 2015. "Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: advances, challenges and perspectives." *J Eukaryot Microbiol* 62 (1):149-56. doi: 10.1111/jeu.12184.
- Urbina, Julio A. 2017. "Pharmacodynamics and Follow-Up Period in the Treatment of Human *Trypanosoma Cruzi* Infections With Posaconazole." *Journal of the American College of Cardiology* 70 (2):299-300. doi: 10.1016/j.jacc.2017.03.611.
- van Griensven, Johan, and Ermias Diro. 2012. "Visceral Leishmaniasis." *Infectious Disease Clinics of North America* 26 (2):309-322. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.005.

- Vega, C., M. Rolón, A. R. Martínez-Fernández, J. A. Escario, and A. Gómez-Barrio. 2005. "A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing B-galactosidase." *Parasitology Research* 95 (4):296-298. doi: 10.1007/s00436-005-1300-3.
- Vermeersch, M., R. I. da Luz, K. Tote, J. P. Timmermans, P. Cos, and L. Maes. 2009. "In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences." *Antimicrob Agents Chemother* 53 (9):3855-9. doi: 10.1128/AAC.00548-09.
- Waite, R. C., Y. Velleman, G. Woods, A. Chitty, and M. C. Freeman. 2016. "Integration of water, sanitation and hygiene for the control of neglected tropical diseases: a review of progress and the way forward." *Int Health* 8 Suppl 1:i22-7. doi: 10.1093/inthealth/ihw003.
- WHO. 2010. *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases*. Geneva.
- WHO. 2017. *Integrating neglected tropical diseases into global health and development. Fourth WHO report on neglected tropical diseases*. Geneva.
- Wilkinson, S. R., M. C. Taylor, D. Horn, J. M. Kelly, and I. Cheeseman. 2008. "A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (13):5022-7. doi: 10.1073/pnas.0711014105.
- Xiao, Y., W. Yan, L. Guo, C. Meng, B. Li, H. Neves, P. C. Chen, L. Li, Y. Huang, H. F. Kwok, and Y. Lin. 2017. "Digitoxin synergizes with sorafenib to inhibit hepatocellular carcinoma cell growth without inhibiting cell migration." *Mol Med Rep* 15 (2):941-947. doi: 10.3892/mmr.2016.6096.
- Yang, G., N. Lee, J. R. Ioset, and J. H. No. 2017. "Evaluation of Parameters Impacting Drug Susceptibility in Intracellular *Trypanosoma cruzi* Assay Protocols." *SLAS Discov* 22 (2):125-134. doi: 10.1177/1087057116673796.
- Zhang, J. H. 1999. "A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays." *Journal of Biomolecular Screening* 4 (2).
- Zingales, B., S. G. Andrade, M. R. Briones, D. A. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, A. M. Macedo, C. R. Machado, M. A. Miles, A. J. Romanha, N. R. Sturm, M. Tibayrenc, and A. G. Schijman. 2009. "A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 (7):1051-4.
- Zingales, Bianca, Michael A. Miles, David A. Campbell, Michel Tibayrenc, Andrea M. Macedo, Marta M. G. Teixeira, Alejandro G. Schijman, Martin S. Llewellyn, Eliane Lages-Silva, Carlos R. Machado, Sonia G. Andrade, and Nancy R. Sturm. 2012. "The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications." *Infection, Genetics and Evolution* 12 (2):240-253. doi: 10.1016/j.meegid.2011.12.009.
- Zingales, Bianca, Michael A. Miles, Carolina B. Moraes, Alejandro Luquetti, Felipe Guhl, Alejandro G. Schijman, and Isabela Ribeiro. 2014. "Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 109 (6):828-833. doi: 10.1590/0074-0276140156.

## 7. ANEXO





## Novel chemical starting points for drug discovery in leishmaniasis and Chagas disease



Irene Roquero<sup>a</sup>, Juan Cantizani<sup>a</sup>, Ignacio Cotillo<sup>a</sup>, M. Pilar Manzano<sup>a</sup>, Albane Kessler<sup>a</sup>, J. Julio Martín<sup>a,\*\*</sup>, Case W. McNamara<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Diseases of the Developing World (DDW), Tres Cantos Medicines Development Campus, GSK, Tres Cantos, Spain

<sup>b</sup> Calibr at Scripps Research, La Jolla, CA, USA

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Visceral leishmaniasis  
Chagas disease  
Drug discovery  
HTS  
Open innovation

### ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) and Chagas disease (CD) are caused by kinetoplastid parasites that affect millions of people worldwide and impart a heavy burden against human health. Due to the partial efficacy and toxicity-related limitations of the existing treatments, there is an urgent need to develop novel therapies with superior efficacy and safety profiles to successfully treat these diseases. Herein we report the application of whole-cell phenotypic assays to screen a set of 150,000 compounds against *Leishmania donovani*, a causative agent of VL, and *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of CD, with the objective of finding new starting points to develop novel drugs to effectively treat and control these diseases. The screening campaign, conducted with the purpose of global open access, identified twelve novel chemotypes with low to sub-micromolar activity against *T. cruzi* and/or *L. donovani*. We disclose these hit structures and associated activity with the goal to contribute to the drug discovery community by providing unique chemical tools to probe kinetoplastid biology and as hit-to-lead candidates for drug discovery.

### 1. Introduction

Chagas disease (CD) and visceral leishmaniasis (VL) are both neglected tropical diseases (NTDs) with several aspects in common: they are both vector-borne diseases caused by parasites included in the kinetoplastid class, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp., respectively; they are considered high-morbidity, low-mortality diseases; the available treatments are inadequate and new drugs are urgently needed (WHO, 2017).

This paper reports the application of high-throughput, whole-cell phenotypic assays to screen a set of 150,000 compounds from Calibr at Scripps Research against axenic *L. donovani* amastigotes and *T. cruzi* trypomastigotes with the objective of finding new starting points to develop improved drugs to treat visceral leishmaniasis and Chagas disease. Applying learnings from clinical development, *T. cruzi*-active hits were prioritized for compounds that imparted cidal activity against the trypomastigote and amastigote stages of the lifecycle. Whereas the *L. donovani* screen cascade progressed from hit compounds against axenic amastigotes into a counterscreen against intramacrophage amastigotes to ensure greater physiological relevance for final hit compound

prioritization.

#### 1.1. Visceral leishmaniasis

Based on clinical presentation, leishmaniasis is classified into three distinct syndromes: cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. The last one, also known as *kala-azar*, is caused by *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*, although clinical manifestation not only depends on the parasite species but also on the patient immune response (Georgiadou et al., 2015). It is estimated that 12 million people suffer from leishmaniasis worldwide and 350 million, across 88 countries, remain at risk of infection. Cutaneous leishmaniasis, caused by more than ten *Leishmania* species, is widely distributed with 0.7–1.2 million new cases per year, whereas 90% of VL cases are reported in just six countries: India, Bangladesh, Sudan, South Sudan, Brazil and Ethiopia. It is estimated that 0.2–0.4 million cases of VL occur every year (Alvar and Arana, 2017; Alvar et al., 2012).

*Leishmania* spp. have a complex life cycle with two distinct parasite stages: the promastigote form, found in the sand-fly vector, and the amastigote form, present inside several types of mammalian host cells.

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [Julio.J.Martin@gsk.com](mailto:Julio.J.Martin@gsk.com) (J.J. Martín), [cmcnamara@scripps.edu](mailto:cmcnamara@scripps.edu) (C.W. McNamara).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.05.002>

Received 3 October 2018; Received in revised form 13 May 2019; Accepted 16 May 2019

Available online 22 May 2019

2211-3207/ © 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of Australian Society for Parasitology. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Briefly, the infection begins with the bite of an infected female sandfly for blood feeding. During the bite, promastigotes are released into the mammalian skin, where they invade several types of cells such as macrophages. The promastigote is then internalized into a parasitophorous vacuole where it transforms into an amastigote. After an intense amastigote replication, the macrophage membrane ruptures releasing the amastigotes into the surrounding tissue. These amastigotes can invade new cells or even be ingested by a new sandfly vector during a subsequent blood meal (Teixeira et al., 2013).

Unlike the other leishmaniasis presentations, the fatality rate of VL without treatment is approximately 90%, often due to hemorrhagic or infectious complications of the disease. The current therapeutic arsenal against VL includes pentavalent antimonials, amphotericin B, miltefosine, paromomycin and pentamidine. More recently, liposomal amphotericin B has been adopted as the front-line treatment of VL because it has the highest efficacy and lower safety risks amongst all the available drugs. However, amphotericin B can be cost-prohibitive in resource-limited settings and it requires intravenous administration. On the other hand, miltefosine is orally administered, but is contraindicated in women who are pregnant or of child-bearing potential. While the ideal treatment would have a low cost-of-goods, be administered orally, have minimal toxicity, not be contraindicated, and be highly efficacious, it is important to develop drugs with a novel mechanism of action to overcome the emerging drug-resistant parasites (Georgiadou et al., 2015; No, 2016).

## 1.2. Chagas disease

Clinically, CD has two phases of manifestation: the acute and the chronic phase. During the acute phase, which usually remains asymptomatic, parasites can be detected by blood PCR during the first 4–8 weeks following infection. The subsequent activation of the immune system leads to a decrease in the parasite load and triggers the start of the chronic phase. Without treatment, the chronic phase will persist for the remainder of the patient's life. Although 60–70% of patients with a chronic infection will never progress into symptomatic disease, the remaining 30–40% of chronically infected individuals will suffer a severe cardiac or digestive syndrome within 10–30 years after the initial infection (Chatelain, 2015). According to WHO, around 6–7 million people are infected and 75 million are at risk of infection with *T. cruzi*, mainly in Latin American countries (WHO, 2017).

During its life cycle, *T. cruzi* parasites alternate between different morphological and functional stages: the amastigote and epimastigote forms are replicative stages found in the mammalian host and in the triatomine vector, respectively, while trypomastigotes are the infective form present in both hosts. The infection begins when a triatomine insect bites the mammalian host and defecates into the skin wound. The feces of an infected triatomine have trypomastigotes, which can successfully establish infection. Once inside the mammalian host, the parasite can invade several types of nucleated cells. In the cytoplasm, trypomastigotes transform into amastigotes, which replicate intensively. Then amastigotes differentiate again into trypomastigotes and the host cell ruptures releasing those parasites into the blood. The circulating trypomastigotes can invade new cells or be ingested by a triatomine vector during a blood meal. During the vector stages of the life cycle, trypomastigotes will transform into epimastigotes, replicate and differentiate into infective metacyclic trypomastigotes that will be excreted with the feces (Bern, 2015; Teixeira et al., 2012). Thus, within the human host, both the trypomastigotes and amastigote stages should be targeted, either by a dual-acting compound or by a combination therapy, to achieve maximal efficacy.

Benznidazole and nifurtimox, the current treatment options for Chagas disease, are only effective during the acute phase of the disease and present important adverse effects (Sales Junior et al., 2017). Benznidazole can produce hypersensitivity, bone marrow suppression and peripheral neuropathy, while nifurtimox usually produces

gastrointestinal maladies and up to 30% of the patients might develop central nervous system perturbations. Importantly, nifurtimox use represents a higher risk of heart failure when compared to benznidazole (Bermúdez et al., 2016). The first drugs tested in recent clinical trials were azoles such as posaconazole, based on promising preclinical data; however, posaconazole was found to be trypanostatic, which likely contributed to low clinical efficacy. In the STOP-CHAGAS trial, posaconazole and benznidazole exhibited efficacy of 19% and 62%, respectively (Morillo et al., 2017a). These findings underscore the importance of assessing cidal activity of compound hits at the onset of drug development to avoid wasted efforts and resources on compounds that only exert static effects on parasite development within the human host. Moreover, in the case of benznidazole-treated group, 32% of the patients had to permanently discontinue treatment due to side effects. Again highlighting the urgency to develop new treatments with greater efficacy in both acute and chronic phase that will also demonstrate improved safety profiles over the currently available drugs (Bern, 2015, 2017; Morillo et al., 2015, 2017a, 2017b).

## 1.3. Working together to tackle NTDs

A collaborative initiative between GSK and Calibr at Scripps Research (Calibr) was set through the Tres Cantos Open Lab Foundation (TCOLF) with the aim of providing new chemical starting points to tackle these diseases (Ballell et al., 2016).

High throughput screening (HTS) has become the classical drug discovery approach to evaluate large chemical libraries to identify novel lead series to address the lack of efficacious and safe treatments for these NTDs. Amongst the screening strategies, either target-based or phenotypic screens may be deployed to discover small-molecule inhibitors, and each has its advantages and limitations. In the field of anti-infective drug discovery, target-based screening shows a high attrition rate, partly due to the poor translation from biochemical to cellular activity and *in vivo* efficacy. Many factors, such as cell permeability and even non-essentiality of the target in the context of the human host, can contribute to this translational disconnect. Thus, phenotypic assays are the preferred screening strategy for anti-kinetoplastid drug discovery (Don and Ioset, 2014; Martín et al., 2018) to overcome many of those limitations created in a target-based screen. A consequence of phenotypic screening is that the corresponding drug target is unknown until target deconvolution studies can be conducted on the hit series. An important consideration for phenotypic screening campaign is that the screen cascade must balance those assays that permit high-throughput screening to manage large compound libraries yet preserve key secondary assays to characterize screen hits for prioritization of clinically relevant starting points.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Compound library and resupply

The Diversity Library from Calibr is comprised of small molecule compounds derived from commercial and propriety sources totaling ~150,000 compounds. This library was prepared as a 2 mM stock solution dissolved in DMSO and maintained in 1536-well low dead volume source plates (plate # LP-0400; Labcyte Inc) that are compatible for acoustic transfer. Final screen concentration (5  $\mu$ M) was dictated by the % DMSO tolerance of the parasites.

For screening, assay-ready plates were used because of the limitation of high-throughput compound transfer equipment in the BSL3 laboratory at GSK (Tres Cantos site). Generally, assay-ready plates were prepared at Calibr, then the sealed plates were shipped on dry ice to GSK in Tres Cantos. Plates were thawed overnight prior to cell dispense and briefly centrifuged (30 s at 100  $\times$  g) to ensure all compound was collected at the bottom of the assay well before removal of the seal. Specifically, 1536-well assay-ready plates were prepared by

acoustically transferring 30 nL of compound stock per well, and 250 nL was transferred per well for 384-well plates by using an Echo liquid handler (Labcyte, Inc.). Plates were immediately sealed and placed at  $-20^{\circ}\text{C}$  storage until shipment on dry ice. Single shot (SS) experiments were run at  $5\ \mu\text{M}$  final compound concentration. For dose response (DR) experiments, 11-point, one-to-three dilution series were prepared with  $50\ \mu\text{M}$  as starting concentration for *L. donovani* and *T. cruzi* assays and  $100\ \mu\text{M}$  for HepG2 assay.

For the hit reconfirmation phase, the available powder resupply stocks were purchased from the commercial vendors that sourced the screen compounds. 76 *T. cruzi* hits and 63 *L. donovani* hits were available for resupply from ChemDiv and Life Chemicals. All compound purity ( $> 95\%$ ) and molecular mass were confirmed using liquid chromatography-mass spectrometry analysis using a Single Quad ZQ (Waters) coupled to an Extend-C18 Rapid Resolution  $3.5\ \mu\text{m}$  HPLC column (Waters).

## 2.2. Parasites and mammalian cell cultures

THP-1 cells (human monocytic leukemia) were made available by GSK Biological Reagents and Assay Development Department (BRAD, Stevenage, UK). LdBOB axenic amastigotes expressing eGFP were kindly provided by Manu de Rycker from Dundee University and used for all *L. donovani* assays. LLC-MK2 cells (green monkey kidney epithelial cells) were purchased from the European Cell Cultures Collection (ECACC reference 85062804) and used to expand the *T. cruzi* parasite population. NIH-3T3 cells (mouse endothelial fibroblasts) were made available by GSK-Biological Reagents and Assay Development Department (BRAD, Stevenage, UK). H9c2 (rat cardiomyocytes) were purchased at the European Cell Cultures Collection (ECACC, Salisbury, UK). *T. cruzi* parasites from the Tulahuen strain expressing  $\beta$ -galactosidase were kindly provided by Dr. Buckner (University of Washington, Seattle, USA) and used for all *T. cruzi* assays. Parasites were maintained in culture by weekly infection of LLC-MK2 cells. Trypomastigote forms were obtained from the supernatants of LLCMK2 infected cultures harvested between days 5 and 9 of infection, as described in 2.4.2.

## 2.3. Leishmania donovani

### 2.3.1. Axenic amastigote assay

For the primary screen assay,  $6\ \mu\text{L}$  per well of eGFP LdBOB axenic amastigotes at a final concentration of  $1 \times 10^5$  cells/mL in amastigotes assay media containing  $500\ \text{U/mL}$  penicillin/streptomycin (Invitrogen™) were dispensed in the assay plates (Greiner #782092). Control columns (100% growth inhibition) contained  $6\ \mu\text{L}$  per well of amastigotes assay media. Plates were incubated for 72 h, at  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$ . Then  $2\ \mu\text{L}$  per well of a resazurin solution ( $0.2\ \mu\text{M}$  in phosphate buffered saline (PBS) with Igepal (Sigma-Aldrich),  $0.2\%$  (v/v)) were added and plates were incubated for 4 h at room temperature before fluorescence signal was detected. Cells were counted using a CASY cell counter (Roche-Applied Science), plates were dispensed with a Multidrop Combi dispenser (Thermo Scientific) and a PerkinElmer Envision (excitation/emission at 528/590 nm) was used as plate reader. This assay was adapted from Peña et al. (2015).

### 2.3.2. Intra-macrophage *L. donovani* (InMac) assay

For this High Content Imaging assay, THP-1 cells were counted using a CASY cell counter and were differentiated in  $225\ \text{cm}^2$  T-FLASK in the presence of  $30\ \text{nM}$  PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma-Aldrich) at a final concentration of  $6 \times 10^5$  cells/mL. Following incubation for 24 h at  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$ , cell differentiation was visually confirmed using an optical microscope. Cells were washed using cell culture media (RPMI (Invitrogen™), 10% FBS (Gibco), 25 mM Hepes (Invitrogen™), 1.25 mM Sodium pyruvate (Invitrogen™), 2.5 mM L-Glutamine (Invitrogen™)) and then were infected using eGFP LdBOB axenic amastigotes (counted with a CASY cell counter) at a multiplicity

of infection of 10 (i.e.  $6 \times 10^6$  parasites/mL) in the T-FLASK containing differentiated THP-1 cells. After overnight incubation, the remaining parasite was removed washing each T-FLASK with sterile PBS and the infected cells were harvested by treatment with  $0.05\%$  (w/v) trypsin plus  $0.48\ \text{mM}$  EDTA for 5 min. A cell preparation with a final concentration of  $2 \times 10^5$  cells/mL was prepared in assay media consisting of RPMI (Invitrogen™), 2% FBS (Gibco) and 25 mM sodium bicarbonate (Invitrogen™) containing  $30\ \text{nM}$  of PMA.  $50\ \mu\text{L}$  of infected cells were plated onto 384-well plates (Greiner #781091) containing compounds using a Multidrop Combi dispenser. Non-infected cells were used as positive control of 100% compound response and were counted and  $50\ \mu\text{L}$  were dispensed in control columns. Plates were incubated for 96 h at  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  and then fixed with a  $4\%$  (v/v) formaldehyde-PBS solution for 30 min at room temperature. Then, wells were washed with PBS and stained with  $10\ \text{mg/mL}$  DAPI plus  $0.1\%$  (v/v) Triton X-100 in PBS for 30 min at room temperature using an EL406 multi well plate-washer (BioTek). After a second washing step with PBS,  $50\ \mu\text{L}$  of PBS were added to each well. Then, plates were read on a high-content microscope (Opera QEHS) using a  $20 \times$  objective, 3 fields per well. Two exposure images were taken for each well using 405 nm and 488 nm laser excitation. Automated image analysis was performed with a script developed on Acapella® High Content Imaging and Analysis Software (PerkinElmer). Three outputs were provided for each sample well: (1) THP-1 cell count to determine drug-related cytotoxicity (aka Mac); (2) average number of amastigotes per macrophage as infection level measurement (aka AmMac); and (3) percentage of infected cells per well as a second infection marker (aka InfCel). This assay was adapted from Peña et al. (2015).

### 2.3.3. *L. donovani* inMac horse serum assay

This assay was previously described by Tegazzini et al. (2016). In brief, the procedure is the same as for InMac assay described in 2.3.2, although assay media contains 2% horse serum (Gibco) instead of FBS. Horse serum (HS) promotes the differentiation of intracellular parasites to a more amastigote-like form and permits the evaluation of compound effect on intracellular parasite replication. Specifically, the *in vitro* replication rate more closely mimics *in vivo* rates (2-day doubling time) and there is no discernible effect on host cell viability (Tegazzini et al., 2016). Three outputs are measured for each sample well: (1) THP-1 cell count to determine drug-related cytotoxicity (aka Mac-HS); (2) average number of amastigotes per macrophage as infection level measurement (aka AmMac-HS); and (3) percentage of infected cells per well as a second infection marker (aka InfCel-HS).

## 2.4. Trypanosoma cruzi

### 2.4.1. $\beta$ -galactosidase assay

For the primary screen assay,  $6\ \mu\text{L}$  per well of a solution containing  $1.67 \times 10^5$  NIH-3T3 cells/mL and  $1.67 \times 10^5$  trypomastigotes/mL in DMEM assay media was dispensed in the 1536-well plates (Greiner #782092) with a Multidrop Combi dispenser. Control columns (100% growth inhibition) contained  $6\ \mu\text{L}$  per well of  $1.67 \times 10^5$  trypomastigotes/mL solution. Plates were incubated for 96 h, at  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$ . Then  $2\ \mu\text{L}$  per well of a  $20\ \mu\text{M}$  resorufin- $\beta$ -D-galactopyranoside (Sigma-Aldrich) solution (in PBS supplemented with  $0.2\%$  Igepal) were added and plates were incubated for 4 h at room temperature before fluorescence signal was detected using a PerkinElmer Envision plate reader (excitation/emission at 531/595 nm). This assay was adapted from Peña et al. (2015).

### 2.4.2. *T. cruzi* intracellular imaging assay

For this high-content imaging assay, H9c2 cells were seeded in  $225\ \text{cm}^2$  T-FLASK in DMEM with 10% FBS for 4 h to allow attachment. *T. cruzi* trypomastigotes, collected at days 5–8 after infection from LLC-MK2 parasite infected cultures, were allowed to swim out for 4 h at  $37^{\circ}\text{C}$  from a centrifuged pellet ( $1600 \times g/10\ \text{min}$ ). Trypomastigotes

were then collected and counted in a CASY Cell Counter. Trypomastigotes, in supplemented DMEM, were added to H9c2 cultures in a multiplicity of infection of 1 and incubated for 18 h. Cells were washed once with PBS before incubation of the infected H9c2 monolayer with trypsin (Life-Technologies) to detach cells from the flask. Cells were counted in a CASY Cell Counter and their density set at  $5 \times 10^4$  cells/mL in supplemented DMEM. Infected H9c2 were dispensed into 384-well plates at 50  $\mu$ L per well using a Multidrop Combi dispenser. After seeding them, the plates were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 72 h. Cultures were then fixed and stained with 50  $\mu$ L per well of an 8% formaldehyde and 4  $\mu$ M DRAQ5 DNA dye (BioStatus, UK) in PBS solution. Then plates were read in a PerkinElmer Opera QEHS using a 20  $\times$  objective, 5 fields per well. DRAQ5 signal was detected using 635 nm excitation laser and a 690/50 emission detection filter. Automated image analysis was performed with a script developed on Acapella® High Content Imaging and Analysis Software (PerkinElmer). Three outputs were provided for each sample well: (1) number of host cells nuclei to determine drug-related cytotoxicity (aka H9c2); (2) number of amastigotes per cell as infection level measurement (aka AmCel); and (3) percentage of infected cells per well as a second infection marker (aka InfCel). This assay was adapted from Alonso-Padilla et al. and Peña et al. (Alonso-Padilla et al., 2015; Peña et al., 2015).

#### 2.4.3. Trypomastigote assay

The trypomastigote assay was run in 384-well plates (Greiner #781074) by dispensing 50  $\mu$ L of a solution of  $1 \times 10^6$  trypomastigotes/mL in culture media (DMEM (Invitrogen™), 2% FBS (Biowest), 200 U/mL penicillin/streptomycin (Invitrogen™)). *T. cruzi* trypomastigotes were obtained as described in section 2.4.2. Control columns (100% growth inhibition) contained 50  $\mu$ L per well of culture media. Plates were incubated for 24, 48 or 72 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> and then developed using CellTiter-Glo® Reagent (50  $\mu$ L per well) using a Multidrop Combi dispenser. Plates were left for 10 min at room temperature for stabilization and then luminescence was read using a PerkinElmer Envision plate reader.

#### 2.5. HepG2 cytotoxicity assay

This assay was previously described by Peña et al. (2015). Briefly, actively growing HepG2 cells were harvested and a cell suspension at a final density of  $1.2 \times 10^5$  cells/mL in Eagle's MEM (containing 10% FBS, 1% NEAA, 1% penicillin/streptomycin) was dispensed into 384-well plates (Greiner #781091) using a Multidrop Combi dispenser (25  $\mu$ L, 3000 cells per well). Plates were incubated for 48 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, then developed using CellTiter-Glo® Reagent (25  $\mu$ L per well) using a Multidrop Combi dispenser. Plates were left for 10 min at room temperature for stabilization and then read using a PerkinElmer ViewLux reader.

#### 2.6. Data analysis

Data were normalized to percent of biological response by using positive (i.e. highest response achieved by a chemical tool compound, RCtrl2) or negative (i.e. lowest response achieved in the absence of any testing compound, RCtrl1) controls by using the following equation:

$$\% \text{Response} = \frac{|\text{Rctrl1} - \text{Rx}|}{|\text{Rctrl1} - \text{Rctrl2}|} \times 100$$

where Rx is the assay response measured for the compound X. RCtrl1 and RCtrl2 are calculated as the average of replicates in the same microtiter plate where the compound X is tested.

Assay performance statistics, such as signal to background ratio, Z' and robust 3  $\times$  SD activity cutoff (Zhang, 1999) were calculated using templates in ActivityBase XE (IDBS, Guilford, Surrey, UK). Hit population analysis and visualization were conducted using Spotfire DecisionSite (Spotfire, Inc., Somerville, Massachusetts). pIC<sub>50</sub> values

(pIC<sub>50</sub> = - log IC<sub>50</sub>) were obtained using the ActivityBase XE nonlinear regression function in the full curve analysis bundle. Dose response curves were fitted to the 4-parameter logistic equation curve with a floating upper asymptote in the range of 80–120%. To address toxicity, compound selectivity index (SI) was calculated as SI = pIC<sub>50</sub> Antiparasitic output - pIC<sub>50</sub> Mammalian cell line (THP1/H9c2/HepG2).

#### 2.7. Biosafety

Several parasite and mammalian cell lines were used in the assays described above: *Leishmania donovani* LdBOB axenic amastigotes expressing GFP, *Trypanosoma cruzi* Tulahuén strain expressing  $\beta$ -galactosidase, THP-1 (human monocytic leukemia) cell line, LLC-MK2 (green monkey kidney epithelial cells), NIH-3T3 (mouse endothelial fibroblasts), H9c2 (rat cardiomyocytes) and HepG2 (liver hepatocellular carcinoma cells).

Experimental work with live *L. donovani* or *T. cruzi* cells were carried out following standard operating procedures in compliance with biosafety level 3 regulations. HepG2 and THP-1 cells were treated according to GSK policies for management of human biological samples.

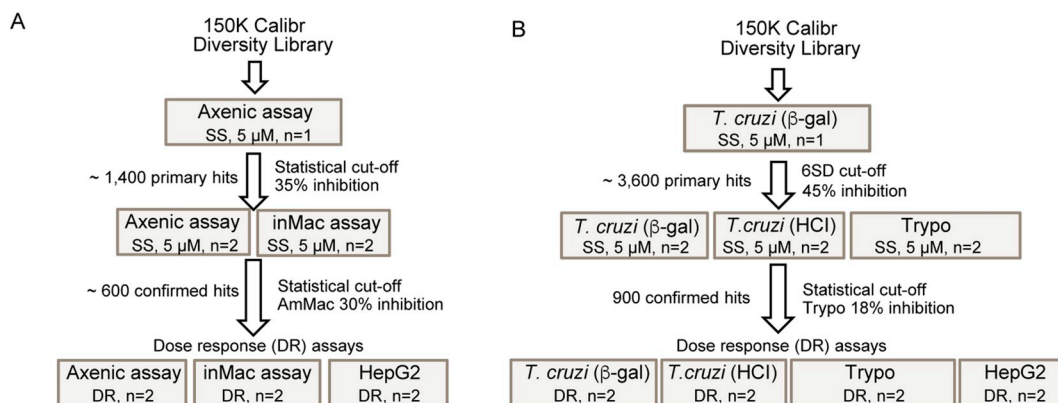
### 3. Results and discussion

When designing an HTS campaign, it is important to choose the most relevant *in vitro* assay in the disease to improve translation to *in vivo* and clinic results because significant differences may exist in drug sensitivity between different life-cycle stages of the parasite (Martín et al., 2018). However, it is worth noting that to screen large compound libraries it is necessary to employ assays with enough throughput and cost-effectiveness to justify this approach. This consideration is paramount for biosafety level 3 (BSL3) pathogens, such as *L. donovani* and *T. cruzi*, which require stringent safety protocols, but may limit access to screening automation available to BSL1 or 2 agents. Therefore, the primary screens against *L. donovani* and *T. cruzi* in this screening campaign employed practical, high-throughput, cost-effective primary screens conducive in a BSL3 setting then counterscreened against the reduced set of screen hits in a more relevant, lower throughput assay to further downselect to higher priority compound hits. Our hypothesis was that this strategy would provide a high-throughput approach to identify starting points for kinetoplastid drug discovery. Furthermore, for *T. cruzi*, an additional assay to assess trypomastigote cidal activity was employed to further characterize the value of compound hits.

#### 3.1. *L. donovani* HTS campaign

Measuring activity of compounds in antiparasitic *in vitro* assays requires recapitulating the disease conditions, including parasite life-cycle stage and relevant host cells. Taking this into account, *L. donovani* amastigotes have been identified as disease-relevant form of the parasite (Martín et al., 2018).

However, it is not rationale to exclusively assay axenic parasites because *L. donovani* is known to invade host cells and establish intracellular infections. Although an axenic assay has the advantage of being a high-throughput assay, it also has major drawbacks: axenic amastigotes are different from intracellular amastigotes regarding protein expression and drug susceptibility, permeability barriers and pH gradients introduced by the phagolysosome are not recapitulated in the assay media, and compounds affecting parasite-host interaction cannot be identified with this assay (De Rycker et al., 2013). Necessitating a balance between assay throughput in a BSL3 environment and physiological relevance, hits selected with the less physiologically relevant axenic hit compounds were re-evaluated against a representative intramacrophage (InMac) assay, that provides a more disease-relevant screening condition. The InMac assay is a high-content imaging assay which is allows for concomitant measurement of multiple parameters to inform on the effects of the screen compound against both the parasite



**Fig. 1.** Progression cascade for the screening campaign against *L. donovani* (A) and *T. cruzi* (B). Compounds were either screened in a singular concentration (SS, single shot) of 5  $\mu$ M or in dose-response (DR) format to generate half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>). The number of technical replicates (n) are noted for each assay. Assay definitions: inMac = High-content imaging assay of *L. donovani* intramacrophage infection and proliferation; *T. cruzi* ( $\beta$ -gal) = *T. cruzi* tryptomastigote  $\beta$ -galactosidase assay; *T. cruzi* (TchCl) = High-content imaging assay of *T. cruzi* intracellular amastigote infection and proliferation; Trypo = *T. cruzi* tryptomastigote viability assay (24, 48 or 72 h); HepG2 = 72 h mammalian cytotoxicity assay with HepG2 cell line.

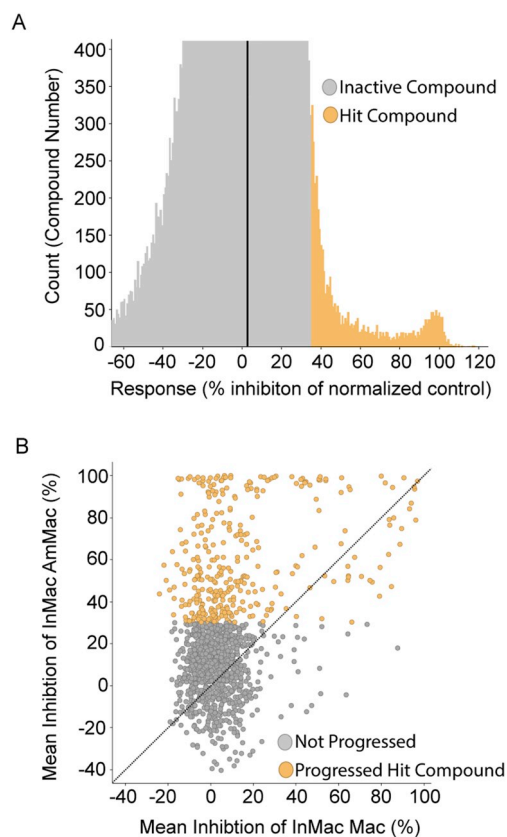
and host cell. The multi-parametric readout is powerful for hit analysis and includes measurement of the number of amastigotes per macrophage (AmMac), the percentage of infected cells (InfCel) to measure compound efficacy, and measurement of compound cytotoxicity against the human macrophage THP-1 host cells (Mac output). Thus, non-toxic compounds showing more potent half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) in the efficacy outputs, AmMac and InfCel, can be prioritized for demonstrating selective activity.

The screening progression cascade (Fig. 1A) devised for this workflow began with the determination of growth inhibition of *L. donovani* amastigotes in the axenic assay described in section 2.3.1. The average Z' value for this HTS was 0.57 and a total number of 109 plates were assayed. Using a robust activity cut off of three standard deviations (3  $\times$  SD), 1392 hits were selected from the 150,000 compounds tested (hit rate near 1%) (Fig. 2A). These primary screen hits were re-confirmed against both the axenic and the more physiologically relevant InMac assays. Within the InMac assay, the robust 3  $\times$  SD activity cutoff for AmMac output (which correlated to 30% inhibition of parasite proliferation) produced 560 hits (Fig. 2B). Nitroaromatic compounds and PAINS (Pan-Assay Interference Compounds) were discarded to eliminate compounds with known toxicity liabilities (Baell and Holloway, 2010). Subsequent reconfirmatory dose-response assays against axenic amastigotes, InMac and HepG2 cell line (an additional representative mammalian cell line to further assess potential cytotoxicity) were performed in duplicate using resupplied powder stock of all available compounds (63 compounds in total). Application of potency (AmMac pIC<sub>50</sub> > 5) and selectivity (Selectivity Index (SI) > 1) filters generated five chemotype families (Table 1; denoted as hit clusters A to E) and four singletons (Table 1) prioritized for additional biological profiling (Section 3.3).

Evaluation of assay data quality was assessed by calculating Z' value and in all cases a Z' value > 0.4 was achieved, which is viewed as an acceptable metric for generating dose-response data. Additionally, Amphotericin B and Miltefosine were included as controls to ensure reproducible assay sensitivity was maintained between assay plates and assay batches. The effect of these standard drugs were reproducible and generated comparable IC<sub>50</sub> values in both the axenic and InMac assays. The high sensitivity of the intramacrophage high-content imaging assay permits a decreased assay incubation time and provides concomitant measurement of intracellular parasite numbers and host cell cytotoxicity.

### 3.2. *T. cruzi* HTS campaign

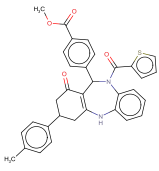
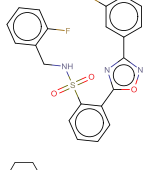
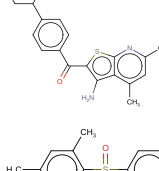
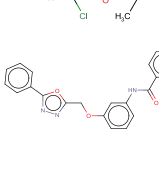
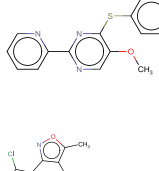
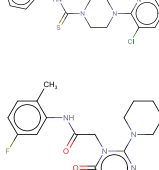
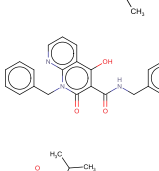
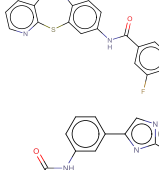
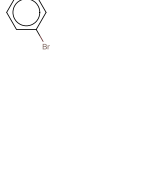

The screening progression cascade of the *T. cruzi* HTS campaign



**Fig. 2.** (A) Representation of compound distribution by % inhibition of *L. donovani* axenic amastigote growth in the primary screen. Inactive and active hit compounds are color-coded gray and orange, respectively. (B) Distribution of the hits selected from primary screen according to InMac assay results during single point confirmation phase. Amastigote-specific activity (y-axis; on-target effect) is plotted against the measured % inhibition of host macrophage cells (x-axis; off-target effect). Those compounds that were progressed (orange) or deprioritized for a lack of activity and/or selectivity (gray) are color-coded. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

(Fig. 1B) started with the determination of growth inhibition of *T. cruzi* parasites in the  $\beta$ -galactosidase assay described in section 2.4.1. This assay was preferred because of the high-throughput screening capacity in the BSL3 environment, allowing for testing of the entire 150,000

**Table 1**  
Hit compound structures and corresponding assay activities from the *L. donovani* and *T. cruzi* screening campaigns.

Activity <sup>a</sup>	Compound Id.	Structure	ID <sup>b</sup> and priority <sup>c</sup>	<i>L. donovani</i>			<i>T. cruzi</i>		HepG2 <sup>e</sup> (pCC50)
				Axenitic assay (pIC50)	InMac assay (pIC50)	InMac HS assay <sup>d</sup> (pIC50)	High-content imaging assay (pIC50)	Trypomastigote assay (pIC50)	
Both parasites	TCOLFS068570		Cluster A (H)	5.93 ± 0.01	AmMac <sup>f</sup> 6.3 ± 0.25 InfCel <sup>g</sup> 6.27 ± 0.2 Mac <sup>h</sup> < 4.3	AmMac HS 6.17 ± 0.19 InfCel HS 6.09 ± 0.11 Mac HS 4.53 ± 0.28	AmCel 5.85 ± 0.11 InfCel 4.4 ± 0.25 H9c2 <sup>i</sup> < 4.3	24 h < 4.3 48 h < 4.3 72 h < 4.3	< 4
	TCOLFS018919		Cluster B (H)	5.80 ± 0.15	AmMac 5.68 ± 0.30 InfCel 5.09 ± 0.65 Mac < 4.3	AmMac HS 4.89 ± 0.32 InfCel HS 4.75 ± 0.30 Mac HS < 4.3	AmCel 5.71 ± 0.30 InfCel 5.38 ± 0.30 H9c2 < 4.3	24 h < 4.3 48 h < 4.3 72 h 4.53 ± 0.27	< 4
	TCOLFS026832		Cluster C (H)	6.53 ± 0.03	AmMac 6.47 ± 0.26 InfCel 6.32 ± 0.17 Mac 4.5 ± 0.31	AmMac HS 6.13 ± 0.05 InfCel HS 5.96 ± 0.09 Mac HS 4.62 ± 0.45	AmCel 7.98 ± 0.23 InfCel 7.64 ± 0.28 H9c2 < 4.3	24 h 7.28 48 h 7.08 72 h 7.41 ± 0.19	< 4
	TCOLFS026398		Cluster D (H)	--	AmMac 5.09 ± 0.06 InfCel 5.03 ± 0.1 Mac < 4.3	--	AmCel 6.65 ± 0.2 InfCel 6.37 ± 0.2 H9c2 < 4.3	24 h to -48 h to -72 h 6.06 ± 0.16	< 4
	TCOLFS129266		Cluster E (L)	6.54 ± 0.01	AmMac 6.28 ± 0.33 InfCel 5.62 ± 0.78 Mac 4.90 ± 0.18	--	AmCel 6.77 ± 0.01 InfCel 6.68 ± 0.03 H9c2 4.42 ± 0.02	24 h to -48 h to -72 h 6.24 ± 0.01	4.69 ± 0.01
<i>L. donovani</i>	TCOLFS098882		Singleton (H)	5 ± 0.04	AmMac 5.82 ± 0.55 InfCel 5.2 ± 0.09 Mac 4.46 ± 0.22	--	AmCel 5.37 ± 0.06 InfCel 5.17 ± 0.24 H9c2 5.61	24 h to -48 h to -72 h 5.66 ± 0.01	< 4
	TCOLFS006487		Singleton (L)	5.23 ± 0.05	AmMac 5.64 ± 0.32 InfCel 5.38 ± 0.09 Mac 4.53 ± 0.25	--	AmCel 5.89 ± 0.06 InfCel 5.79 ± 0.06 H9c2 5.28 ± 0.1	24 h to -48 h to -72 h 5.94 ± 0.02	4.33 ± 0.38
	TCOLFS079469		Singleton (H)	6.38 ± 0.03	AmMac 6.25 ± 0.28 InfCel 4.62 ± 0.46 Mac < 4.3	--	AmCel < 4.3 InfCel < 4.3 H9c2 < 4.3	24 h to -48 h to -72 h < 4.3	< 4
	TCOLFS124301		Singleton (H)	5.51	AmMac 5.46 ± 0.04 InfCel 5.28 ± 0.08 Mac < 4.3	--	--	--	4.58 ± 0.82
<i>T. cruzi</i>	TCOLFS008553		Cluster F (H)	--	AmMac < 4.3 InfCel < 4.3 Mac 4.42 ± 0.19	AmMac HS < 4.3 InfCel HS < 4.3 Mac HS 4.52 ± 0.27	AmCel 6.3 ± 0.11 InfCel 5.88 ± 0.11 H9c2 4.36 ± 0.08	24 h 5.66 ± 0.06 48 h 5.31 ± 0.08 72 h 5.44 ± 0.05	< 4
	TCOLFS129639		Cluster G (L)	--	AmMac 5.01 ± 0.17 InfCel 4.31 ± 0.01 Mac 4.74 ± 0.21	AmMac HS 4.78 ± 0.15 InfCel HS 4.52 ± 0.06 Mac HS 4.42 ± 0.16	AmCel 6.45 ± 0.11 InfCel 6.13 ± 0.27 H9c2 4.41 ± 0.12	24 h 4.8 48 h 5.27 72 h 5.84 ± 0.08	< 4
	TCOLFS025993		--	--	--	--	--	--	< 4

(continued on next page)

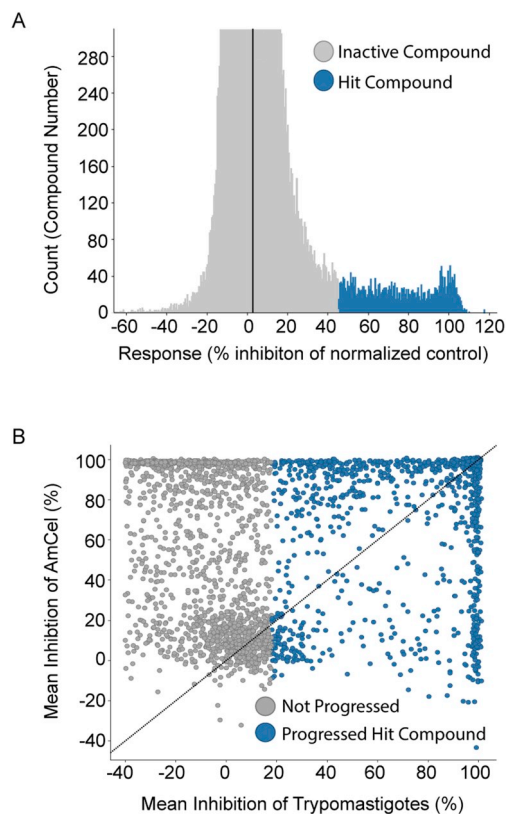
Table 1 (continued)

Activity <sup>a</sup>	Compound Id.	Structure	ID <sup>b</sup> and priority <sup>c</sup>	<i>L. donovani</i>			<i>T. cruzi</i>		HepG2 <sup>e</sup> (pCC50)
				Axenic assay (pIC50)	InMac assay (pIC50)	InMac HS assay <sup>d</sup> (pIC50)	High-content imaging assay (pIC50)	Trypomastigote assay (pIC50)	
			Cluster H (M)		AmMac 4.84 ± 0.21 InfCel 4.52 ± 0.24 Mac 4.36 ± 0.09	AmMac HS 4.64 ± 0.43 InfCel HS < 4.3 Mac HS 4.44 ± 0.28	AmCel 6.68 ± 0.2 InfCel 72 h 6.49 ± 0.19 H9c2 < 4.3	24 h < 4.3 48 h < 4.3 72 h 5.59 ± 0.11	
	TCOLFS059386		Singleton (L)	--	--	--	AmCel 5.9 ± 0.06 InfCel 5.82 ± 0.1 H9c2 < 4.3	24 h to -48 h to < 4 -72 h 5.27 ± 0.01	
			Singleton (L)	--	AmMac < 4.3 InfCel < 4.3 Mac < 4.3	AmMac HS 4.73 ± 0.01 InfCel HS 4.41 ± 0.16 Mac HS 4.89 ± 0.04	AmCel 6.3 ± 0.12 InfCel 72 h 6.03 ± 0.18 H9c2 < 4.3	24 h < 4.3 48 h < 4.3 72 h 4.83 ± 0.77	
	TCOLFS089113		Singleton (L)	--	--	--	AmCel 6.85 ± 0.14 InfCel 6.48 ± 0.1 H9c2 < 4.3	24 h to -48 h to < 4 -72 h 6.33 ± 0.06	
			Cluster I (L)	--	--	--	AmCel 6.85 ± 0.14 InfCel 6.48 ± 0.1 H9c2 < 4.3	24 h to -48 h to < 4 -72 h 6.33 ± 0.06	
	TCOLFS135869		Singleton (M)	--	--	--	AmCel 6.07 ± 0.04 InfCel 5.98 ± 0.07 H9c2 < 4.3	24 h to -48 h to < 4 -72 h 5.27 ± 0.01	
			Singleton (M)	--	--	--	AmCel 6.07 ± 0.04 InfCel 5.98 ± 0.07 H9c2 < 4.3	24 h to -48 h to < 4 -72 h 5.27 ± 0.01	
	TCOLFS112845		Singleton (M)	--	--	--	AmCel 6.27 ± 0.01 InfCel 5.97 ± 0.08 H9c2 < 4.3	24 h to -48 h to < 4 -72 h 5.72 ± 0.01	
			Singleton (M)	--	--	--	AmCel 6.27 ± 0.01 InfCel 5.97 ± 0.08 H9c2 < 4.3	24 h to -48 h to < 4 -72 h 5.72 ± 0.01	
	TCOLFS002713		Singleton (L)	--	--	--	AmCel 6.0 ± 0.01 InfCel 5.88 ± 0.08 H9c2 < 4.3	24 h to -48 h to < 4 -72 h 4.42 ± 0.1	
			Singleton (L)	--	--	--	AmCel 6.35 ± 0.02 InfCel 5.87 ± 0.11 H9c2 < 4.3	24 h to -48 h to < 4 -72 h 5.64 ± 0.01	
	TCOLFS050529		Singleton (L)	--	--	--	AmCel 6.35 ± 0.02 InfCel 5.87 ± 0.11 H9c2 < 4.3	24 h to -48 h to < 4 -72 h 5.64 ± 0.01	
			Singleton (L)	--	--	--	AmCel 6.13 ± 0.03 InfCel 5.76 ± 0.1 H9c2 < 4.3	24 h to -48 h to < 4 -72 h 5.69 ± 0.01	
	TCOLFS099080		Singleton (L)	--	--	--	AmCel 6.13 ± 0.03 InfCel 5.76 ± 0.1 H9c2 < 4.3	24 h to -48 h to < 4 -72 h 5.69 ± 0.01	
			Singleton (M)	--	--	--	AmCel 6.21 InfCel 5.87 ± 0.11 H9c2 4.85 ± 0.05	24 h to -48 h to < 4 -72 h 5.64	
	TCOLFS013976		Singleton (M)	--	--	--	AmCel 6.21 InfCel 5.87 ± 0.11 H9c2 4.85 ± 0.05	24 h to -48 h to < 4 -72 h 5.64	
			Singleton (M)	--	--	--	AmCel 6.21 InfCel 5.87 ± 0.11 H9c2 4.85 ± 0.05	24 h to -48 h to < 4 -72 h 5.64	
	TCOLFS148231		Singleton (M)	--	--	--	AmCel 6.21 InfCel 5.87 ± 0.11 H9c2 4.85 ± 0.05	24 h to -48 h to < 4 -72 h 5.64	

-- not tested.

\*Compounds determined to not be novel; novel compounds shown in Table 3.

<sup>a</sup> Compounds are classified per their antiparasitic activity (both parasites, *L. donovani*, or *T. cruzi*).<sup>b</sup> Hits are categorized as either a hit cluster (2 or more related analogs; clusters A–I) or singletons (i.e., those hits with no related analogs).<sup>c</sup> The hit priority level based on biological activity (H: high, meets desirable activity profile; M: medium, slow-acting compound or missing activity profiling; L: low, undesirable activity profile).<sup>d</sup> HS denotes replacement of FBS with horse serum in the *L. donovani* inMac assay.<sup>e</sup> Additional mammalian cytotoxicity was measured against HepG2 (hepatocellular carcinoma) cell line.<sup>f</sup> AmCel: High-content imaging assay out measuring the number of amastigotes per cell.<sup>g</sup> InfCel: High-content imaging assay out measuring the number of infected host cells per well.<sup>h</sup> Mac: Macrophage host cell for *L. donovani* intracellular high-content imaging assay.<sup>i</sup> H9c2: Embryonic cardiomyocyte host cell for *T. cruzi* intracellular high-content imaging assay.



**Fig. 3.** (A) Representation of compound distribution by % inhibition of *T. cruzi* growth measured in the  $\beta$ -galactosidase assay used for the primary screen. Inactive and active hit compounds are color-coded gray and blue, respectively. (B) Distribution of the hits selected from primary screen according to high-content imaging and 72 h trypomastigote assays results during single point confirmation phase. Those compounds that were progressed (blue) or deprioritized for a lack of activity against trypomastigote ( $\leq 20\%$  inhibition) (gray) are color-coded. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

compound library. Importantly, active compounds in the  $\beta$ -galactosidase assay will target intracellular amastigotes in NIH-3T3 cells, though to a smaller extent they may also target free swimming trypomastigotes, the invasive form, present in the culture medium, and/or inhibit essential host-parasite interactions required for successful parasite invasion (Peña et al., 2015). The average Z' value for HTS was 0.85 and a total number of 109 plates were assayed. Following screen analysis, 3598 compounds were selected as primary hits showing inhibition greater than 45% (cut-off at six standard deviations ( $6 \times SD$ )) (Fig. 3A)

These hit compounds were tested in duplicate for confirmation in the  $\beta$ -galactosidase, a high-content imaging assay of intracellular infection and the trypomastigote assay, described in section 2.4. Hit advancement criteria were defined by activity confirmation in both the  $\beta$ -galactosidase and high-content imaging assay, and a statistical cut-off of 18% inhibition in trypomastigote assay at 72 h incubation time. This resulted in the selection of 1337 compounds (Fig. 3B). Due to the high number of hit compounds, structural similarity clustering (Tanimoto cut-off of 80%) was used to identify highly related chemical scaffolds. Within each cluster, a maximum of three compounds were selected and prioritized according to the following calculated properties: lipophilicity, solubility, efflux pump substrate and volume of distribution. As with the *L. donovani* HTS campaign, nitroaromatic compounds and PAINS (Pan-Assay Interference Compounds) were discarded, reducing the total number of hits for progression to dose response assay formats to 900 compounds (Baell and Holloway, 2010). Of those 900, compounds were resupplied as powder stocks for reconfirmation testing in

dose-response format amongst a quartet of assays:  $\beta$ -galactosidase activity, high-content imaging of intracellular infection, trypomastigote activity and HepG2 cytotoxicity. In total, 76 compounds were resupplied for dose-response reconfirmation. Nine chemotype families and ten singletons (Table 1) were selected based on efficacy output (AmCel pIC50  $> 6$  in at least one duplicate; a conservative approach to minimize the loss of compounds from false-negative activity), with a selectivity index greater than 1, and confirmatory activity in the trypomastigote assay.

Consistent with the *L. donovani* HTS campaign, evaluation of *T. cruzi* assay data quality was measured using Z' and in all cases values were greater than 0.4. Nifurtimox, benznidazole and posaconazole were included as control compounds in each run to validate the quality of the assay. The control compounds displayed comparable activity in both the  $\beta$ -galactosidase and high-content imaging assay of intracellular infection despite the different incubation times. We speculate that the comparable activity between assays is attributable to greater accuracy of the high-content imaging assay of intracellular infection, which can detect compound efficacy in a shorter duration than the whole well, fluorescence-based readout used for the  $\beta$ -galactosidase assay.

Aligned with the objective of finding novel starting points to treat Chagas disease, nitroaromatic compounds were deprioritized at the confirmation phase. It is well known that nitroaromatic compounds such as benznidazole and nifurtimox cause severe adverse effects that may lead to treatment discontinuation. In addition, both benznidazole and nifurtimox are prodrugs that share their activation process through the mitochondrial nitroreductase of *T. cruzi*. This provides potential for cross-resistance and underscores the importance of identifying new drugs that target different biochemical pathways (Francisco et al., 2015). Furthermore, this compound class is already well represented in the drug discovery pipeline for Chagas disease. Considering compounds such as fexinidazole, currently undergoing clinical trials, and despite the advances, other novel chemical entities are still needed (Moraes et al., 2014).

One of the major challenges of Chagas disease drug discovery is the poor understanding on the key drivers to guide translation between *in vitro* and *in vivo* models and clinical outcomes. An exemplar is the unfortunate failure of posaconazole in clinical trials. Different causes have been attributed as reasons for this failure, such as incorrect dosing regimen (Urbina, 2017) or differential susceptibility of *T. cruzi* DTU strains (Francisco et al., 2015; Moraes et al., 2014). However, unlike benznidazole, posaconazole is trypanostatic and this is viewed as an unfavourable attribute for anti-Chagas drugs. In an attempt to differentiate and prioritize these novel chemotypes, trypomastigote cidal activity was assessed to determine whether these compounds profiled more closely with trypanostatic CYP51 inhibitors (e.g. posaconazole) or the cidal nitroaromatic compounds (e.g. nifurtimox and benznidazole). It has been demonstrated that CYP51 inhibitors have maximal activity against replicating parasites whereas minimal activity is observed against trypomastigote stage parasites ( $> 3$ -log decrease in potency) (MacLean et al., 2018). This is an alternative approach to the epimastigote-based assay described by Sykes et al. to identify CYP51 inhibitors (Sykes and Avery, 2018).

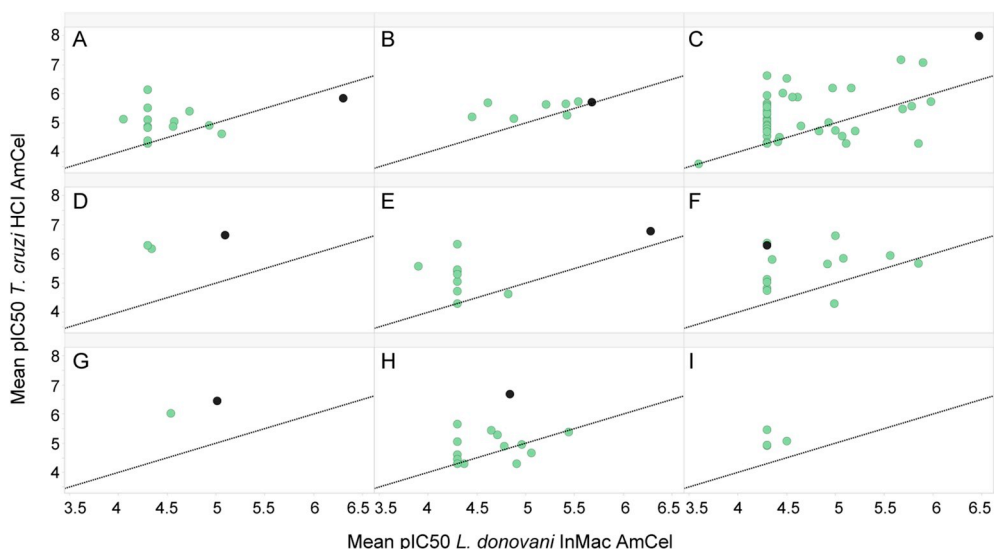
### 3.3. Biological profiling of selected hits

The selected hits available for resupply were profiled in up to three general assay formats: high-content imaging assays of intracellular amastigote infection to reconfirm activity, *T. cruzi* trypomastigote assay at 24, 48 and 72 h and *L. donovani* InMac supplemented with horse serum (HS) (Table 1). To complement this activity profiling of the resupplied hit compounds, all available hit analogs were also profiled against the standard high-content imaging (HCI) assays of intracellular amastigote infection and *T. cruzi* trypomastigotes at 72 h (Table 2). All resupplied hit compounds reconfirmed activity against at least one of the two parasite species and activities ranged from sub-micromolar

**Table 2**

Assay activity summary of the nine hit clusters identified from the *L. donovani* and *T. cruzi* screen campaign. “Active compounds” are those with AmMac or AmCel pIC<sub>50</sub> > 5 and only selective compounds were considered (Mac or H9c2 pIC<sub>50</sub> < 5).

Cluster ID	Compounds tested	<i>L. donovani</i>		<i>T. cruzi</i>		
		Number of active compounds	InMac assay pIC <sub>50</sub> range	Number of active compounds	Imaging assay pIC <sub>50</sub> range	Trypomastigotes assay 72 h pIC <sub>50</sub> range
A	15	2	AmMac 5.06–6.30 InfCel 4.91–6.27 Mac < 4.3	6	AmCel 5.05–5.85 InfCel < 4.3–4.91 H9c2 < 4.3–4.77	< 4.3–4.88
B	8	5	AmMac 5.21–5.68 InfCel 4.91–5.19 Mac < 4.3–4.6	8	AmCel 5.16–5.73 InfCel 4.74–5.38 H9c2 < 4.3–4.52	< 4.3–5.13
C	58	10	AmMac 5.0–6.47 InfCel 4.62–6.32 Mac < 4.3–4.87	23	AmCel 5.02–7.98 InfCel < 4.3–7.64 H9c2 < 4.3–4.96	< 4.3–7.41
D	3	1	AmMac 5.09 InfCel 5.03 Mac < 4.3	3	AmCel 6.18–6.65 InfCel 5.81–6.37 H9c2 < 4.3	5.54–6.06
E	13	1	AmMac 6.28 InfCel 5.62 Mac 4.9	7	AmCel 5.06–6.77 InfCel < 4.3–6.68 H9c2 < 4.3–4.42	< 4.3–6.24
F	13	4	AmMac 5.0–5.85 InfCel < 4.3–5.15 Mac < 4.3–4.86	10	AmCel 5.04–6.63 InfCel 4.43–6.24 H9c2 < 4.3–4.51	4.35–5.92
G	2	1	AmMac 5.01 InfCel 4.31 Mac 4.74	2	AmCel 6.02–6.45 InfCel 5.82–6.13 H9c2 < 4.3–4.41	5.41–5.84
H	19	1	AmMac 5.44 InfCel 5.39 Mac 4.51	6	AmCel 5.05–6.68 InfCel 4.97–6.49 H9c2 < 4.3–4.4	< 4.3–5.59
I	5	0	--	3	AmCel 5.07–6.85 InfCel < 4.3–6.48 H9c2 < 4.3–4.51	< 4.3–6.33



**Fig. 4.** Activity potency distribution of the hit clusters (A–I; See Table 1) against amastigotes from *L. donovani* and *T. cruzi*. The activity of the initial hit compound (black) is shown against two key intracellular assays from each representative kinetoplastid: *L. donovani* InMac AmMac (the number of amastigotes per macrophage (AmMac) in the *L. donovani* intramacrophage assay (InMac)) and *T. cruzi* HCl AmCel (the number of amastigotes per cell) outputs. Resupplied analogs of the initial hit are represented in green. These data were only generated for compounds in which powder resupply was made available for dose-response reconfirmation testing. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

(pIC<sub>50</sub> > 6) for the most potent hits to low, single-digit micromolar (5 > pIC<sub>50</sub> > 6) IC<sub>50</sub> values for the least potent chemotypes (Table 1). The activity profiling lead to binning the hits into three categories: (1) active against both parasites (pIC<sub>50</sub> > 5 for intracellular Ld or Tc HCl assays), (2) *L. donovani*-specific hits (pIC<sub>50</sub> > 5 for Ld HCl, pIC<sub>50</sub> < 5 for Tc HCl), or (3) *T. cruzi*-specific hits (pIC<sub>50</sub> > 5 for Tc HCl, pIC<sub>50</sub> < 5 for Ld HCl). Cluster C was notable simply for its exceptional, low nanomolar activity against intracellular *T. cruzi*. As expected, extended testing of chemically related analogs showed a diverse range of activity, spanning from inactive analogs to those with comparable or even superior activity of the original hit compound (Table 2) (Fig. 4).

In the case of *L. donovani* hits, care was taken to directly assess compound activity against intracellular replication of amastigotes. This was achieved by replacing FBS with HS, and the change in serum prevents extracellular parasites from successfully re-establishing a new intramacrophage infection. This alteration to the *in vitro* assay conditions has been previously shown to have a positive correlation with *in vivo* efficacy (Tegazzini et al., 2016). Unfortunately, compound availability restrictions limited profiling for all chemotypes; however, comparative activity profiling between FBS-supplemented and HS-supplemented media showed comparable activity for all series tested.

Finally, the *T. cruzi* trypomastigote assay was performed using three different incubation times to obtain information about the speed of

action of the compounds together with cidal/static assessment. Compounds active at any time point in the trypomastigote assay are considered cidal, and those active in short incubation times (ideally maximal activity in the 24-h time point) would be prioritized as fast-kill compounds. Examination of the dual-parasite active compounds revealed Clusters A to be inactive at all time points and therefore designated as a very low priority for Chagas drug development. Cluster B, an inherently weak compound hit, only demonstrated detectable activity at the final 72-h time point, which suggests it may be slow-acting, whereas Cluster C confirmed a ‘fast-kill’ compound profile from the dual-parasite active list. Amongst the *T. cruzi*-specific hits, Cluster H demonstrated a slow onset of action (i.e. no detectable activity until the 72-h time point) whereas the other two hit clusters were categorized as ‘fast-kill’ compounds. Kill kinetics were not assessed for hit singletons and only activity at the 72-h time point was measured. Singletons TCOLFS089113 and TCOLFS050529 were the only hit compounds that failed to show significant activity against trypomastigotes and therefore merit deprioritization relative to the other active hit compounds because of the lack of cidality.

Further structural comparison of these reconfirmed compound hits to previously disclosed chemotypes (Peña et al., 2015) revealed high similarity to known kinetoplastid-active compounds (Table 3). Although the rediscovery of known compounds eliminates their novelty, their discovery also validates the success of our workflow. Further review of historical screen data at Calibr for *Plasmodium falciparum* (human malaria) erythrocytic stages (unpublished data), *Cryptosporidium parvum* intracellular asexual stages (Love et al., 2017), *Wolbachia*-infected *Drosophila* (Bakowski et al., 2019), and *Mycobacterium tuberculosis* broth and intramacrophage assays (unpublished data) did not identify these chemical scaffolds as hits. These observations were further validated using a cheminformatic approach. Reaxys, a web-based database of publicly disclosed compounds (<http://www.reaxys.com>), was used to perform similarity and substructure searches of the compound hits listed in Table 1. Of the twenty-one compounds searched, nine compounds (see Table 3) were discovered to have had prior disclosures for kinetoplastid activity. A tenth compound, the 1,5-benzodiazepine substructure representative of Cluster A (TCOLFS068570) has previously been reported as an allosteric inhibitor of NS5B polymerase in hepatitis C virus (McGowan et al., 2009; Vandyck et al., 2009). Yet, no reports for kinetoplastid drug discovery were identified. All remaining twelve compounds had no associated publication/public disclosure, supporting the specific and selective nature of these compounds for kinetoplastid drug discovery.

Based on the novel activity against *L. donovani* and/or *T. cruzi* without prior disclosure and the activity criterion we established for hit prioritization, the finalized list of chemical starting points numbered twelve chemotypes in total (6 singletons and 6 hit clusters; Clusters A–D, F, H and singletons TCOLFS098882, TCOLFS079469, TCOLFS124301, TCOLFS112845, TCOLFS002713, and TCOLFS148231). Interestingly, five of these prioritized chemotypes (hit clusters B–D, singletons TCOLFS098882 and TCOLFS006487) demonstrate activity

**Table 3**

Hit compounds in which anti-kinetoplastid activity was previously reported.

Compound ID	Cluster Id.	Analog	Reference
TCOLFS129266	E	TCMDC-143197	Peña et al. (2015)
TCOLFS006487	Singleton	TCMDC-143247 TCMDC-143097	
TCOLFS059386	Singleton	TCMDC-143193 TCMDC-143194	
TCOLFS089113	Singleton	TCMDC-143426	
TCOLFS135869	I	TCMDC-143248	
TCOLFS050529	Singleton	TCMDC-143465	
TCOLFS099080	Singleton	TCMDC-143109	
TCOLFS013976	Singleton	TCMDC-143511	
TCOLFS129639	G	GNF6702	(Khare et al., 2016)

against the amastigote stage of both kinetoplastid species. With the exception of Cluster A, all *T. cruzi*-active compounds demonstrated trypomastigote cidality, which we deemed an essential property for a chemical starting point for Chagas drug discovery. Presumably, the novelty of these compounds may also result in the identification of equally novel drug targets. Thus, we also view these compounds as powerful chemical tools to probe parasite biology and target identification.

The joint discovery of novel anti-kinetoplastid compounds between our institutes (TCOLF and Calibr) is an exemplar of the scientific advances that can be accomplished in the context of open innovation, and disclosure of these screen results, including compound structures, are meant to encourage continued drug development for two, important, neglected tropical diseases. As next steps, medicinal chemistry is required for resynthesis of the highest priority compounds for reconfirmation of biological activity and to enable structural confirmation of hit compounds. Resynthesis will provide sufficient powder stock to submit compounds to *in vitro* ADME assays, particularly liver microsomal stability data (mouse, rat and human), kinetic solubility, Caco-2 permeability assay, and human CYP inhibition panel (CYP1A, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4). These assays would be useful to further characterize the drug-like properties of these compound series and further prioritize candidates for hit-to-lead chemistry.

### Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgements

This work was supported by the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number OPP1107194]. The additional support and funding of Tres Cantos Open Lab Foundation is gratefully acknowledged. We thank Carmen Espejo and Vanessa Barroso for the technical assistance in the screening and biological profiling of the compounds, Calibr HTS and compound management groups, and Arnab K. Chatterjee and Silvia González Del Valle for chemistry advice.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.05.002>.

### References

- Alonso-Padilla, J., Cotillo, I., Presa, J.L., Cantizani, J., Peña, I., Bardera, A.L., Martin, J.J., Rodriguez, A., 2015. Automated high-content assay for compounds selectively toxic to *Trypanosoma cruzi* in a myoblastic cell line. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 9, e0003493.
- Alvar, J., Arana, B., 2017. I. Appraisal of Leishmaniasis Chemotherapy, Current Status and Pipeline Strategies Chapter 1. *Leishmaniasis, Impact and Therapeutic Needs*. pp. 1–23.
- Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., Team, W.H.O.L.C., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7, e35671.
- Baell, J.B., Holloway, G.A., 2010. New substructure filters for removal of Pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem.* 53, 2719–2740.
- Bakowski, M.A., Shiroodi, R.K., Liu, R., Olejniczak, J., Yang, B., Gagaring, K., Guo, H., White, P.M., Chappell, L., Debec, A., Landmann, F., Dubben, B., Lenz, F., Struever, D., Ehrens, A., Frohberger, S.J., Sjoberg, H., Pionnier, N., Murphy, E., Archer, J., Steven, A., Chunda, V.C., Fombad, F.F., Chounna, P.W., Njouendou, A.J., Metuge, H.M., Ndzheshang, B.L., Gandjui, N.V., Akumtogh, D.N., Kwenti, T.D.B., Woods, A.K., Joseph, S.B., Hull, M.V., Xiong, W., Kuhen, K.L., Taylor, M.J., Wanji, S., Turner, J.D., Hubner, M.P., Hoerauf, A., Chatterjee, A.K., Roland, J., Tremblay, M.S., Schultz, P.G., Sullivan, W., Chu, X.J., Petrassi, H.M., McNamara, C.W., 2019. Discovery of short-course anti-wolbachial quinazolines for elimination of filarial worm infections. *Sci. Transl. Med.* 11.
- Ballell, L., Strange, M., Cammack, N., Fairlamb, A.H., Borysiewicz, L., 2016. Open Lab as a source of hits and leads against tuberculosis, malaria and kinetoplastid diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 292.
- Bermúdez, J., Davies, C., Simonazzi, A., Real, J.P., Palma, S., 2016. Current drug therapy

- and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop.* 156, 1–16.
- Bern, C., 2015. Chagas' disease. *N. Engl. J. Med.* 373, 456–466.
- Bern, C., 2017. A new epoch in antitrypanosomal treatment for Chagas disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 948–950.
- Chatelain, E., 2015. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J. Biomol. Screen* 20, 22–35.
- De Rycker, M., Hallyburton, I., Thomas, J., Campbell, L., Wyllie, S., Joshi, D., Cameron, S., Gilbert, I.H., Wyatt, P.G., Frearson, J.A., Fairlamb, A.H., Gray, D.W., 2013. Comparison of a high-throughput high-content intracellular *Leishmania donovani* assay with an axenic amastigote assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2913–2922.
- Don, R., Ioset, J.R., 2014. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology* 141, 140–146.
- Francisco, A.F., Lewis, M.D., Jayawardhana, S., Taylor, M.C., Chatelain, E., Kelly, J.M., 2015. Limited ability of posaconazole to cure both acute and chronic trypanosoma cruzi infections revealed by highly sensitive in vivo imaging. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 4653–4661.
- Georgiadou, S.P., Makaritsis, K.P., Dalekos, G.N., 2015. Leishmaniasis revisited: current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *J. Transl. Int. Med.* 3, 43–50.
- Khare, S., Nagle, A.S., Biggart, A., Lai, Y.H., Liang, F., Davis, L.C., Barnes, S.W., Mathison, C.J.N., Myburgh, E., Gao, M.Y., Gillespie, J.R., Liu, X., Tan, J.L., Stinson, M., Rivera, I.C., Ballard, J., Yeh, V., Groessl, T., Federe, G., Koh, H.X.Y., Venable, J.D., Bursulaya, B., Shapiro, M., Mishra, P.K., Spraggon, G., Brock, A., Mottram, J.C., Buckner, F.S., Rao, S.P.S., Wen, B.G., Walker, J.R., Tuntland, T., Molteni, V., Glynn, R.J., Supek, F., 2016. Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. *Nature* 537, 229–233.
- Love, M.S., Beasley, F.C., Jumani, R.S., Wright, T.M., Chatterjee, A.K., Huston, C.D., Schultz, P.G., McNamara, C.W., 2017. A high-throughput phenotypic screen identifies clofazimine as a potential treatment for cryptosporidiosis. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 11, e0005373.
- MacLean, L.M., Thomas, J., Lewis, M.D., Cotillo, I., Gray, D.W., De Rycker, M., 2018. Development of *Trypanosoma cruzi* in vitro assays to identify compounds suitable for progression in Chagas' disease drug discovery. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 12, e0006612.
- Martín, J., Cantizani, J., Peña, I., 2018. Chapter 5 the pursuit of novel anti-leishmanial agents by high-throughput screening (HTS) of chemical libraries. In: *Drug Discovery for Leishmaniasis*. The Royal Society of Chemistry, pp. 77–100.
- McGowan, D., Nyanguile, O., Cummings, M.D., Vendeville, S., Vandeyck, K., Van den Broeck, W., Boutton, C.W., De Bondt, H., Quiryren, L., Amssoms, K., Bonfanti, J.F., Last, S., Rombauts, K., Tahri, A., Hu, L., Delouvroy, F., Vermeiren, K., Vandercruyssen, G., Van der Helm, L., Cleiren, E., Mostmans, W., Lory, P., Pille, G., Van Emelen, K., Fanning, G., Pauwels, F., Lin, T.I., Simmen, K., Raboisson, P., 2009. 1,5-Benzodiazepine inhibitors of HCV NS5B polymerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett* 19, 2492–2496.
- Moraes, C.B., Giardini, M.A., Kim, H., Franco, G.H., Araujo-Junior, A.M., Schenkman, S., Chatelain, E., Freitas-Junior, L.H., 2014. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Sci. Rep.* 4, 4703.
- Morillo, C.A., Marin-Neto, J.A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi Jr., A., Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F., Velazquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., Connolly, S.J., Yusuf, S., Investigators, B., 2015. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 373, 1295–1306.
- Morillo, C.A., Waskin, H., Sosa-Estani, S., Del Carmen Bangher, M., Cuneo, C., Milesi, R., Mallagray, M., Apt, W., Beloscar, J., Gascon, J., Molina, I., Echeverria, L.E., Colombo, H., Perez-Molina, J.A., Wyss, F., Meeks, B., Bonilla, L.R., Gao, P., Wei, B., McCarthy, M., Yusuf, S., Investigators, S.-C., 2017a. Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic T. *Cruzi* carriers: the STOP-CHAGAS trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 939–947.
- Morillo, C.A., Waskin, H., Sosa-Estani, S., del Carmen Bangher, M., Cuneo, C., Milesi, R., Mallagray, M., Apt, W., Beloscar, J., Gascon, J., Molina, I., Echeverria, L.E., Colombo, H., Perez-Molina, J.A., Wyss, F., Meeks, B., Bonilla, L.R., Gao, P., Wei, B., McCarthy, M., Yusuf, S., Morillo, C., Sosa-Estani, S., Waskin, H., Meeks, B., Yusuf, S., Diaz, R., Acquatella, H., Lazzari, J., Roberts, R., Traina, M., Meeks, B., Bonilla, L.R., Gao, P., Taylor, A., Holadyk-Gris, I., Whalen, L., Bangher, M.C., Romero, M.A., Prado, N., Hernández, Y., Fernandez, M., Riarte, A., Scollo, K., Lopez-Albizu, C., Cuneo, C.A., Gutiérrez, N.C., Milesi, R.R., Berli, M.A., Mallagray, M.H., Cáceres, N.E., Beloscar, J.S., Petrucci, J.M., Colombo, H., Dellatorre, M., Prado, A., Apt, W., Zulantay, I., Echeverria, L.E., Isaza, D., Reyes, E., Wyss, F.S., Figueroa, A., Guzmán Melgar, I., Rodríguez, E., Gascon, J., Aldasoro, E., Posada, E.J., Serret, N., Molina, I., Sánchez-Montalvá, A., Perez-Molina, J.A., López-Vélez, R., Reyes-López, P.A., 2017b. Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic T. *Cruzi* carriers. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 939–947.
- No, J.H., 2016. Visceral leishmaniasis: revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Trop.* 155, 113–123.
- Peña, I., Pilar Manzano, M., Cantizani, J., Kessler, A., Alonso-Padilla, J., Bardera, A.I., Alvarez, E., Colmenarejo, G., Cotillo, I., Roquero, I., de Dios-Anton, F., Barroso, V., Rodriguez, A., Gray, D.W., Navarro, M., Kumar, V., Sherstnev, A., Drewry, D.H., Brown, J.R., Fiandor, J.M., Julio Martin, J., 2015. New compound sets identified from high throughput phenotypic screening against three kinetoplastid parasites: an open resource. *Sci. Rep.* 5, 8771.
- Sales Junior, P.A., Molina, I., Fonseca Murta, S.M., Sanchez-Montalva, A., Salvador, F., Correa-Oliveira, R., Carneiro, C.M., 2017. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: a review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 97, 1289–1303.
- Sykes, M.L., Avery, V.M., 2018. 3-pyridyl inhibitors with novel activity against *Trypanosoma cruzi* reveal in vitro profiles can aid prediction of putative cytochrome P450 inhibition. *Sci. Rep.* 8, 4901.
- Tegazzini, D., Díaz, R., Aguilar, F., Peña, I., Presa, J.L., Yardley, V., Martín, J.J., Coterón, J.M., Croft, S.L., Cantizani, J., 2016. A replicative in vitro assay for drug discovery against *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 3524–3532.
- Teixeira, D.E., Benchimol, M., Crepaldi, P.H., de Souza, W., 2012. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 6, e1749.
- Teixeira, D.E., Benchimol, M., Rodrigues, J.C.F., Crepaldi, P.H., Pimenta, P.F.P., de Souza, W., 2013. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. *PLoS Pathog.* 9, e1003594.
- Urbina, J.A., 2017. Pharmacodynamics and follow-up period in the treatment of human trypanosoma cruzi infections with posaconazole. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70, 299–300.
- Vandeyck, K., Cummings, M.D., Nyanguile, O., Boutton, C.W., Vendeville, S., McGowan, D., Devogelaere, B., Amssoms, K., Last, S., Rombauts, K., Tahri, A., Lory, P., Hu, L., Beauchamp, D.A., Simmen, K., Raboisson, P., 2009. Structure-based design of a benzodiazepine scaffold yields a potent allosteric inhibitor of hepatitis C NS5B RNA polymerase. *J. Med. Chem.* 52, 4099–4102.
- WHO, 2017. Integrating Neglected Tropical Diseases into Global Health and Development. Fourth WHO report on neglected tropical diseases, Geneva.
- Zhang, J.H., 1999. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen* 4,

