

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 256**

51 Int. Cl.:

C07J 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2008 E 08789194 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2178898**

54 Título: **Compuesto que presenta una actividad antiinflamatoria y una actividad antiviral, composiciones farmacéuticas que comprenden el mismo, procedimiento para la obtención del mismo y utilización del mismo en el tratamiento de la queratoconjuntivitis epidémica y de la queratitis estromal herpética**

30 Prioridad:

11.07.2007 AR P070103089

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.06.2016

73 Titular/es:

**CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET) (50.0%)
AV. RIVADAVIA 1906 PISO 3 DEPTO. F
BUENOS AIRES C1033AAJ, AR y
INIS BIOTECH LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RAMIREZ, JAVIER ALBERTO;
MICHELINI, FLAVIA MARIANA;
GALAGOVSKY, LYDIA RAQUEL;
BERRA, ALEJANDRO y
ALCHE, LAURA EDITH**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

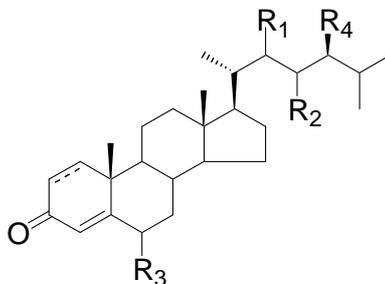
ES 2 573 256 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuesto que presenta una actividad antiinflamatoria y una actividad antiviral, composiciones farmacéuticas que comprenden el mismo, procedimiento para la obtención del mismo y utilización del mismo en el tratamiento de la queratoconjuntivitis epidémica y de la queratitis estromal herpética.

La presente invención se refiere a un compuesto que presenta una actividad antiinflamatoria y una actividad antiviral según la fórmula estructural siguiente:



en la que,

R_1 y R_3 se seleccionan de entre H, HO-, R_5 -O-, HCOO-, R_5 -COO-, -OOC- R_6 -COO-, p-tolueno sulfonato, fosfato, tartrato, maleato, sulfato, flúor, cloro, bromo, yodo y metanosulfonato,

R_2 se selecciona de entre H, HO-, R_5 -O-, HCOO-, R_5 -COO-, -OOC- R_6 -COO-, p-tolueno sulfonato, fosfato, tartrato, maleato, sulfato, flúor, cloro, bromo, yodo,

o $-R_1$ y $-R_2$ pueden ser de manera conjunta -O-,

R_4 y R_5 se seleccionan de entre H y alquilo C_1 - C_4 de cadena lineal o ramificada,

R_6 es $-(CH_2)_n-$ en la que n es igual a 1, 2 o 3, y,



puede ser un enlace simple o un enlace doble, a las composiciones farmacéuticas que lo comprenden, a un procedimiento para su preparación y a su utilización en la preparación de composiciones farmacéuticas. De manera particular, los compuestos de la invención son particularmente útiles en la preparación de fármacos oftálmicos destinados al tratamiento de enfermedades causadas por adenovirus y preferentemente, de la queratoconjuntivitis epidémica. Asimismo, los compuestos de la invención son particularmente útiles en la preparación de fármacos oftálmicos destinados al tratamiento de enfermedades causadas por el herpes simple tipo 1 (VHS-1) y preferentemente, de la queratitis estromal herpética (QH).

Antecedentes de la invención

El adenovirus fue descrito por primera vez como agente antiviral único en 1953 por Rowe *et al.*, mientras intentaban establecer cultivos celulares de amígdalas y tejido adenoideo. Rowe descubrió que un agente transmisible estaba destruyendo las células epiteliales.

Actualmente, es conocido que los adenovirus causan con mucha frecuencia enfermedades del tracto respiratorio. No obstante, dependiendo del serotipo infectante, pueden causar también otras enfermedades tales como por ejemplo gastroenteritis, conjuntivitis, cistitis, hepatitis y exantema. Para algunos serotipos, el cuadro clínico varía dependiendo del lugar de la infección, así tenemos que el serotipo 7, adquirido por inhalación, se encuentra asociado con enfermedades severas del tracto respiratorio inferior, mientras que la transmisión oral del mismo serotipo causa infección asintomática o enfermedad leve.

Los adenovirus son endémicos en la población pediátrica, y se ha mencionado que son responsables de hasta un 10% del total de las infecciones del tracto respiratorio, y que causan el 10% de los casos declarados de gastroenteritis aguda (Rachel Y, Moon MD. Adenovirus infections. Pediatrics in review 1999; 20:230-2).

Los adenovirus son transmitidos por contacto directo, por vía fecal-oral, por vía inhalatoria y ocasionalmente a través de aguas estancadas. Tienen especial predilección por las células epiteliales, afectando a casi todas las mucosas. Son virus ADN, que pertenecen a la familia Adenoviridae y al género Mastadenovirus (Fener F.: Classification and nomenclature of viruses. Intervirology 1976, 1-115).

- 5 Los adenovirus humanos se dividen en 6 géneros designados y clasificados de la A a la F, basados en su habilidad para la aglutinación y se subdividen además en 47 serotipos, de los cuales aproximadamente 33% se asocian a alguna enfermedad (Hierholzer J, Wigand R, Anderson L, *et al.* Adenoviruses from patients with AIDS: A plethora of serotypes and a description of five new serotypes. *J Infect Dis* 1998; 15:804-13; Horwitz M. *Virology*. 2ª ed New York: Reven Press: 1990)
- 10 Los adenovirus son causa frecuente de infecciones del tracto respiratorio en niños, pero muchas de estas infecciones son subclínicas o resultan en enfermedades leves. Sin embargo, en algunos casos causan enfermedad severa (Andrew S, Day D, Mc Gregor D. Fatal adenoviral disease in siblings. *Pediatr Infec Dis J* 1998; 17:83-5.). El espectro de manifestaciones clínicas de los distintos serotipos de adenovirus es muy amplio y muchas veces se superponen.
- 15 Los adenovirus tipo 40 y 41 son una causa importante de diarrea en menores de 2 años (Uhnnoo I, Wadell G, Svensson L, *et al.* Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol* 1998; 20:365). La diarrea y los vómitos son los síntomas predominantes en infecciones entéricas por adenovirus, ya que suceden en 97% y 79% de los niños respectivamente, con una duración promedio de 9 a 12 días.
- 20 El adenovirus serotipo 7 es una causa reconocida de enfermedad severa en niños, y las secuelas pueden incluir enfermedad pulmonar crónica tales como bronquiectasias y pulmón hiperlucente bilateral. La neumonía severa por adenovirus ha sido asociada con inmunosupresión, malnutrición o infección viral severa reciente (Andrew S, Day D, Mc Gregor D. Fatal adenoviral disease in siblings. *Pediatr Infec Dis J* 1998; 17:83-5.).
- 25 En general la sintomatología expresada por el adenovirus depende del serotipo infectante y del/de los órgano(s) blanco afectado(s), mientras que su agresividad está en relación inversa con el estado inmunológico del huésped.
- 30 El adenovirus puede ser también causante de la conjuntivitis folicular aguda. Esta es quizás la infección adenoviral más frecuente y benigna del ojo, es generalmente unilateral y se manifiesta por lesiones foliculares en la superficie conjuntival. Los síntomas se caracterizan por quemazón en el ojo, sensación de cuerpo extraño y eritema conjuntival, resolviéndose en una plazo de entre aproximadamente 10 días y tres semanas. Se ha descrito una forma infantil de queratoconjuntivitis epidémica que afecta a lactantes menores de 2 años de edad. La conjuntivitis pseudomembranosa de modo normal se acompaña de fiebre, faringitis, otitis, diarrea y vómitos (Mandell G, Bennett J, Dolin R. *Principles and practice of infectious disease* 5ª Ed, Philadelphia: Churchill Livingstone 2000.).
- 35 La queratoconjuntivitis epidémica es un proceso infeccioso de origen vírico, el cual se caracteriza por una afectación de la conjuntiva, con secreciones e infiltración de la córnea de aspecto numular. Debido a la naturaleza infecciosa de ésta, suele presentar una tumefacción de los ganglios linfáticos preauriculares.
- 40 Como su nombre lo indica, en la queratoconjuntivitis epidémica existe una afectación conjunta de córnea y conjuntiva debido a, por lo general, una infección por adenovirus serotipo 8, 19 y 37. No obstante, también se ha descrito que, aunque con menor frecuencia, los serotipos 2-5, 7, 9, 10, 11, 14, 16, 21 y 29 también pueden ser causas de esta enfermedad.
- 45 La queratoconjuntivitis epidémica es altamente contagiosa. Preferentemente afecta a adultos que en ocasiones también presentan sintomatología generalizada en forma de malestar general, odinofagia y febrícula. Presenta un inicio muy agudo con sensación de cuerpo extraño importante, edema conjuntival y palpebral, hiperemia mixta y lagrimeo abundante. Toda esta sintomatología progresa rápidamente y alcanzan su máxima intensidad en el tercer día. A las 24 horas se pueden visualizar ya folículos en la conjuntiva. La secreción, que en principio es serosa, se transforma en serofibrinosa, que suele evolucionar a la formación de pseudomembranas. Entre el tercer y quinto día, el cuadro se bilateraliza, aunque la afectación del ojo contralateral es siempre más leve que la del primero. En el 80% de los casos aparece queratitis punctata superficial visible al examen con lámpara de hendidura y tras la instilación de fluoresceína. Estas lesiones se resuelven en un plazo no inferior a 15 días. Este período es más prolongado si se produce en ellas el depósito de inmunocomplejos subepiteliales, por encima de la capa de Bowman. Así constituyen opacidades que dificultan la visión y que tardan en reabsorberse en un periodo de tiempo
- 55 variable que oscila entre meses e incluso años.
- 60 La queratoconjuntivitis epidémica suele ser una entidad frustrante tanto para el paciente como para el profesional, ya que hasta la fecha no se ha desarrollado ningún medicamento que pueda combatir al adenovirus en sí mismo. Hoy en día, frente a la presencia de un diagnóstico de queratoconjuntivitis epidémica suele prescribirse una terapia sintomática basada en lágrimas artificiales, lubricantes, y antiinflamatorios no esteroideos, los cuales pueden únicamente mejorar la incomodidad asociada con esta afección. Si bien los corticosteroides pueden disminuir la gran inflamación que presentan algunos casos, también pueden prolongar el curso clínico de la enfermedad, algunas veces desarrollando incluso infiltrados subepiteliales.
- 65 Además, las infecciones causadas por el virus herpes simple (VHS) están ampliamente diseminadas en la población humana, y ésta resulta ser el único reservorio natural de dicho virus. El virus herpes simple tipo 1 (VHS-1) induce

una enfermedad ocular en humanos llamada queratitis estromal herpética (QH), como consecuencia de una reacción inflamatoria que ocurre en el ojo humano en respuesta a la infección (Cloaue CPM, Menage MJ, Easty DL. Severe herpetic queratitis. I: Prevalence of visual impairment in clinic population. British J. Ophthalmol. 1988;72:530-33). La QH es la principal causa de ceguera en los países industrializados y la primera causa de rechazo de transplante de córnea.

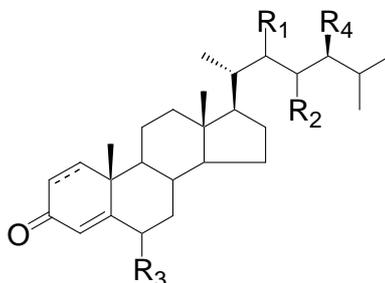
Los estudios en modelos animales han sido de mucha utilidad para reproducir y caracterizar la evolución de la infección inducida por HSV-1, que resulta en una patología asociada con la enfermedad aguda y recurrente (Minagawa H, Sakai Y, Li Y, Ishibashi T, Inomata H y Mori R.: Suppression of infectious virus spread and corneal opacification by the combined use of recombinant interferon beta and interleukin-10 following corneal infection with herpes simple virus-1 in mice. Antiviral Res. 1997;36: 99-105). Así, el modelo murino de infección ocular inducida por VHS-1 constituye una alternativa apropiada para el ensayo de drogas antivirales *in vivo* porque permite reproducir la patología del hombre (Brandt CR, Coakley LM y Grau DR. A murine model of herpes simplex virus-induced ocular disease for antiviral drug testing. J. Virol. Methods 1992;36:209-22).

Los inventores de la presente invención han sintetizado nuevos compuestos que presentan tanto propiedades antiinflamatorias como antivíricas, que son especialmente eficaces para el tratamiento de enfermedades causadas por los adenovirus y/o por el herpes simple tipo 1. De manera particular, los compuestos de la invención son particularmente útiles para la preparación de fármacos oftálmicos destinados al tratamiento de enfermedades causadas por adenovirus y preferentemente, de la queratoconjuntivitis epidémica. También de manera particular, los compuestos de la invención son particularmente útiles para la preparación de fármacos oftálmicos destinados al tratamiento de enfermedades causadas por el herpes simple tipo 1 (VHS-1) y preferentemente, de la queratitis estromal herpética (QH).

L.B. Talarico, *et al.*, Structure Activity relationship studies in a set of new brassinosteroid derivatives assayed against Herpes simples virus type 1 and 2 in cell cultures, Med. Chem. Res. 11:8 (2002) 434-444, describe ensayos de derivados brasinoesteroides sobre su actividad antiviral contra HSV tipo 1 y HSV tipo 2.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere según la reivindicación 1 a un compuesto que presenta una actividad antiinflamatoria y una actividad antiviral según fórmula estructural siguiente



en la que,

R_1 y R_3 se seleccionan de entre H, HO-, R_5 -O-, HCOO-, R_5 -COO-, -OOC- R_6 -COO-, p-tolueno sulfonato, fosfato, tartrato, maleato, sulfato, flúor, cloro, bromo, yodo y metanosulfonato,

R_2 se selecciona entre H, HO-, R_5 -O-, HCOO-, R_5 -COO-, -OOC- R_6 -COO-, p-tolueno sulfonato, fosfato, tartrato, maleato, sulfato, flúor, cloro, bromo, yodo,

o bien - R_1 y - R_2 pueden ser de manera conjunta -O-,

R_4 y R_5 se seleccionan entre H y alquilo C_1 - C_4 de cadena lineal o ramificada,

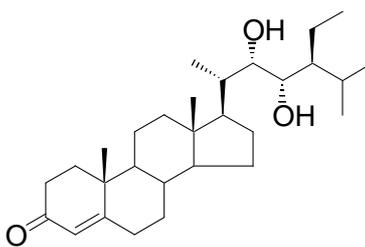
R_6 es $-(CH_2)_n-$ con n igual a 1, 2 o 3, y,



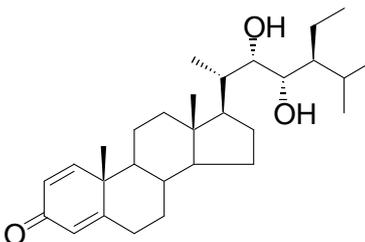
puede ser un enlace simple o un enlace doble

para su utilización en el tratamiento de adenovirus y enfermedades inflamatorias.

En una forma de realización, la invención se refiere a los compuestos denominados I y II:



Compuesto I



5

Compuesto II

En la técnica anterior, en particular en la presentación para el congreso del 22 al 23 de septiembre de 2004 en el XXV Congreso de química, (Ramirez J.A., Alvaredo M., Galagovsky L.R, Wachsmann M.B. y Coto C. Dos análogos sintéticos de 28-homocasterona con acción antiviral in vitro, sep. 2004) se reveló la existencia de un compuesto similar al compuesto I de la presente invención. No obstante, de dicha presentación no surge enseñanza alguna acerca de las propiedades antiinflamatorias del mismo. En dicha presentación tampoco se reveló la actividad de este compuesto contra el adenovirus. De hecho, de las enseñanzas que surgen del mismo y, en particular, del índice de selectividad obtenido para la actividad antiviral contra el Herpes HSV, el experto en la materia no estaría inducido a estudiar las propiedades de dicho compuesto contra la replicación del adenovirus. A conclusiones similares se obtienen de la lectura de Wachsmann M.B. Ramirez J.A., Talarico L., Galagovsky L.R., y Coto C. E., (Antiviral activity of natural and synthetic brassinosteroids, Curr. Med. Chem., Anti-infective Agents, 2004, Vol. 3, No 2). A partir de la lectura de dicha publicación, el experto en la materia no podría deducir las propiedades antiinflamatorias de los compuestos de la invención. Asimismo, a partir de los resultados obtenidos, el experto en la materia no podría deducir las propiedades específicas contra los adenovirus que presentan los compuestos de la invención y mucho menos su utilización en composiciones farmacéuticas. el experto en la materia posiblemente no podría deducir la utilidad de los compuestos de la invención en la preparación de composiciones para uso oftálmico destinadas al tratamiento de la queratoconjuntivitis epidémica y de la queratitis estromal herpética.

25

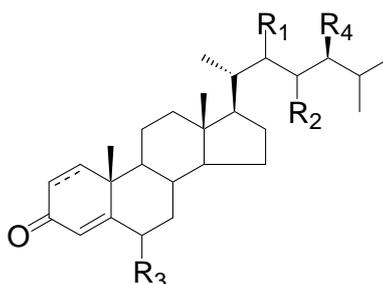
Además, en Jones J.B. y Baskevitch N. (Steroids and Steroidases XX (1) aggregation in aqueous solution of steroids with stigmastane type C-17 side chains and its influence on their enzymic transformations, Steroids, oct 1973, pp 525-538) se describe la obtención de un compuesto similar al compuesto I de la invención, pero con estereoquímicas diferentes en los C-22 y C-23. A partir de la lectura de dicha publicación, el experto en la materia no podría deducir las propiedades antiinflamatorias y las propiedades específicas contra los adenovirus de los compuestos de la invención, como tampoco la utilización de los mismos en composiciones farmacéuticas oftálmicas destinadas al tratamiento de la queratoconjuntivitis epidémica y de la queratitis estromal herpética.

30

Descripción detallada de la invención

35

La presente invención se refiere según la reivindicación 1 a un compuesto que presenta una actividad antiinflamatoria y una actividad antiviral que responde a la fórmula estructural siguiente



40

en la que,

R_1 y R_3 se seleccionan de entre H, HO-, R_5 -O-, HCOO-, R_5 -COO-, -OOC- R_6 -COO-, p-tolueno sulfonato, fosfato, tartrato, maleato, sulfato, flúor, cloro, bromo, yodo y metanosulfonato,

5 R_2 se selecciona entre H, HO-, R_5 -O-, HCOO-, R_5 -COO-, -OOC- R_6 -COO-, p-tolueno sulfonato, fosfato, tartrato, maleato, sulfato, flúor, cloro, bromo, yodo,

o bien - R_1 y - R_2 pueden ser de manera conjunta -O-,

10 R_4 y R_5 se seleccionan de entre H y alquilo C_1 - C_4 de cadena lineal o ramificada,

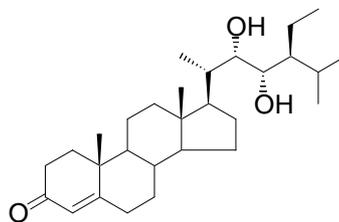
R_6 es -(CH₂)_n- en la que n es igual a 1, 2 o 3, y,



15 puede ser un enlace simple o un enlace doble.

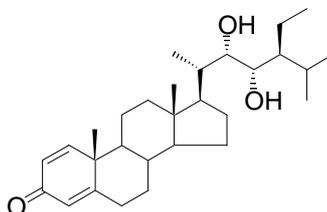
para su utilización en el tratamiento de adenovirus y enfermedades inflamatorias.

En una forma de realización particular, la invención se refiere a los compuestos I y II:



20

Compuesto I



25

Compuesto II

30 Los compuestos de la invención presentan actividad antiinflamatoria y actividad antiviral y son particularmente útiles para inhibir la replicación de los adenovirus y del virus herpes simple tipo 1, lo cual los hace especialmente útiles para la preparación de composiciones farmacéuticas en general y composiciones oftálmicas en particular. Así, es un objeto particular de la invención una composición oftálmica que comprende al menos un compuesto que responda a la fórmula estructural mencionada anteriormente y excipientes farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, la invención se refiere a una composición oftálmica en forma líquida o semisólida que comprende al compuesto I y/o al compuesto II y excipientes farmacéuticamente aceptables.

35

En una forma de realización particular, la invención se refiere a una composición de uso oftálmico destinada al tratamiento de la queratoconjuntivitis epidémica que comprende a uno o más de los compuestos de la invención.

40 Es otro objeto de la invención, una composición de uso oftálmico destinada al tratamiento de la queratitis estromal herpética que comprende a uno o más de los compuestos de la invención.

45 Los ejemplos de soluciones de uso oftálmico para ser administradas en forma de gotas conteniendo a uno o más de los compuestos de la invención pueden ser aquellas en forma de solución estéril acuosa u oleosa, las cuales opcionalmente pueden contener conservantes antimicrobianos, tales como el cloruro de benzalconio. Dichas soluciones pueden estar en forma de monodosis o multidosis. Preferentemente, aquellas en forma de monodosis no contendrán conservantes antimicrobianos. Dichas soluciones deben poseer una viscosidad de aproximadamente 3-7 centistokes, un pH de aproximadamente 5,8 a 7,2 y una osmolaridad de aproximadamente 290 a 310 mosm/kg. El

experto en la materia sabrá seleccionar los excipientes adecuados como para que la solución oftálmica no sea tóxica ni irritante para la conjuntiva y la córnea cuando ésta sea instilada sobre la superficie ocular. Dentro del alcance de la invención, se contemplan también formulaciones en forma de suspensión, loción, gel, preparación semisólida, inserto de uso oftálmico y de aplicación intraocular. El experto en la materia sabrá seleccionar los excipientes adecuados para que dichas formulaciones oftálmicas no sean tóxicas ni irritantes para la conjuntiva y la córnea cuando ésta sea instilada sobre la superficie ocular. También se contempla que la composición oftálmica que comprende a uno o más de los compuestos de la invención permita la liberación controlada de los compuestos de la invención y, en particular que, los compuestos estén unidos o encapsulados dentro de liposomas.

10 Ejemplos de la invención

Ejemplo 1: Obtención de (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona.

En un balón provisto de un refrigerante se disuelven, en atmósfera inerte, 15 gramos de estigmasterol en 750 ml de tolueno anhidro. Se agregan 25 ml de N-metil-4-piperidona, se agita la mezcla y se lleva a ebullición hasta que destilan 50 ml de solvente.

La mezcla se enfría a 60°C y se agregan 7 gramos de isopropóxido de aluminio. La solución se somete a reflujo durante 3 horas, se lleva a temperatura ambiente y se lava sucesivamente con 200 ml de ácido clorhídrico acuoso 5%, 100 ml de bicarbonato de sodio acuoso y finalmente agua.

Se evapora el tolueno a presión reducida y el sólido resultante se recrystaliza de metanol. Se obtienen 12,3 gramos de (22E)-estigmast-4-en-3-ona de punto de fusión 127-128°C.

El producto obtenido se disuelve en una mezcla compuesta por 500 ml de tetrahidrofurano y 100 ml de agua, se agregan 1,5 gramos de bicarbonato de sodio, 10 ml de terc-butanol, 2,8 gramos de matanosulfonamida y 150 mg de tetróxido de osmio.

La solución resultante se calienta a 50°C durante 24 horas y se lleva a temperatura ambiente. Se agregan 12 gramos de bisulfito de sodio disueltos en 100 ml de agua.

El volumen de solvente se reduce a presión reducida hasta aproximadamente 300 ml. La mezcla obtenida se extrae 3 veces con 100 ml de acetato de etilo. El extracto orgánico se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora a sequedad a presión reducida.

El producto crudo se purifica por cromatografía en columna de sílice (solvente de elución: hexano/acetato de etilo 1:1). Se obtienen 8,9 gramos de (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 5,72 (1H, s, H-4); 3,61 (2H, m, H-22 y H-23).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 198,4 (C-3); 170,4 (C-5); 123,9 (C-4); 72,3 (C-22); 70,7 (C-23).

IR: 3300 y 1680 cm⁻¹.

45 Ejemplo 2: Obtención de (22S,23S)-22,23-dihidroxi Colest-4-en-3-ona.

Siguiendo un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, pero utilizando 100 mg de 22-dehidrocolesterol como esteroide de partida, se obtienen 48 miligramos de (22S,23S)-22,23-dihidroxi Colest-4-en-3-ona.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 5,72 (1H, s, H-4); 3,69 (2H, m, H-22 y H-23).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 198,4 (C-3); 170,4 (C-5); 123,9 (C-4); 71,9 (C-22); 70,5 (C-23).

IR: 3300 y 1680 cm⁻¹.

60 Ejemplo 3: Obtención de (22S,23S)-22,23-dihidroxi ergost-4-en-3-ona.

Siguiendo un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 1, pero utilizando 200 miligramos de brassicasterol como esteroide de partida, se obtienen 105 miligramos de (22S,23S)-22,23-dihidroxi ergost-4-en-3-ona.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 5,72 (1H, s, H-4); 3,79 (2H, m, H-22 y H-23).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 198,4 (C-3); 170,4 (C-5); 123,9 (C-4); 72,1 (C-22); 71,0 (C-23).

IR: 3300 y 1680 cm⁻¹.

Ejemplo 4: Obtención de (22R,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona y (22R,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona.

Se disuelven 5 g de (22E)-estigmasta-4,22-dien-3-ona en 30 ml de cloruro de metileno que contienen 2,48 g de ácido metacloroperbenzoico. La mezcla se mantiene a oscuras durante seis días a temperatura ambiente. A continuación, se agregan 300 ml de cloruro de metileno y se lava la solución con carbonato de potasio 10% en agua y a continuación con agua; se seca sobre sulfato de magnesio y se evapora el cloruro de metileno. El residuo sólido (aproximadamente 6 g) contiene aproximadamente un 40% del producto de partida, que puede ser separado del producto deseado por cromatografía en columna de sílice con solvente de elución tolueno/éter etílico (9:1). El producto, 22,23-epoxiestigmast-4-en-3-ona, se obtiene como mezcla de diasterómeros, que puede ser separada por cristalización fraccionada de metanol. De un gramo de la mezcla pueden separarse los diasterómeros, (22R,23S)-22,23-epoxiestigmast-4-en-3-ona, con punto de fusión 111-112°C y (22S,23R)-22,23-epoxiestigmast-4-en-3-ona con punto de fusión 138-140°C (la literatura informa de 117-118 para la mezcla de ambos: Morita K, Iwama T, Kamano Y, Nippon Kagakukai 36, 1332 (1963); Moruçita K, Yamano Y y Iwama T, ibid, 36, 1337 (1963). Se disuelven 900 miligramos de la mezcla de epóxidos isómeros en 30 ml de tetrahidrofurano y se agregó 1,1 ml de ácido perclórico acuoso. La solución se agita durante dos días a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluye con éter (250 ml), a continuación se lava con agua; se seca sobre sulfato de magnesio y se evapora. La purificación se realiza por columna cromatográfica, con solvente tolueno éter (9:1), obteniéndose la mezcla de dioles diasterómeros (750 mg). Una nueva purificación cromatográfica con el mismo solvente, seguida de recristalización de acetona da 320 mg de (22R,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona, de punto de fusión 209-211°C.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 5,72 (1H, s, H-4); 3,80 (2H, m, H-22 y H-23).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 198,4 (C-3); 170,4 (C-5); 123,9 (C-4); 72,3 (C-22); 70,7 (C-23).

IR: 3300 y 1680 cm⁻¹.

La elución posterior permite obtener 280 mg de (22R,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona, punto de fusión 192-194°C.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 5,72 (1H, s, H-4); 3,79 (2H, dd, J = 8 Hz y 3 Hz, H-22 y H-23)

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 198,4 (C-3); 170,4 (C-5); 123,9 (C-4); 72,3 (C-22); 70,7 (C-23).

IR: 3300 y 1680 cm⁻¹

Ejemplo 5: Obtención de (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona y de (22R,23R)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona

Se disuelven 420 mg de (22E)-estigmasta-4,22-dien-3-ona en 100 ml de terc-butanol y se agrega el mismo volumen de agua. Sobre esta mezcla se agregan 0,93 g del auxiliar quiral DHQD₂-Phal, 450 mg (2 mmol) de metansulfonamida, 4,5 g de ferricianuro de potasio, 2 g de carbonato de potasio y 30 mg de osmato de potasio. La mezcla se mantiene con agitación vigorosa, a temperatura ambiente, durante 9 días. La reacción, controlada por cromatografía en capa delgada no se completa. Se agrega bisulfito de sodio sólido, en porciones pequeñas, hasta que cesa el desprendimiento de burbujas. La mezcla se extrae con acetato de etilo, se lava con ácido sulfúrico acuoso 0,25 M, luego con NaOH 10%, y finalmente con agua. La fase orgánica se seca y evapora. El producto crudo se purifica por cromatografía en columna (solvente de elución: hexano/acetato de etilo 1:1). Se obtienen 180 mg de (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona, y posteriormente se eluyen 165 mg de (22R,23R)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 5,72 (1H, s, H-4); 3,72 (1H, d, J = 9Hz, H-23); 3,58 (1H, d, J = 9Hz, H-22).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 198,4 (C-3); 170,4 (C-5); 123,9 (C-4); 74,5 (C-22); 72,6 (C-23).

IR: 3300 y 1680 cm⁻¹

Ejemplo 6: Obtención de (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmasta-1,4-dien-3-ona.

Se disuelven 120 mg de (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona en 15 ml de dioxano anhidro. Se agregan 180 mg de 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) y la mezcla se somete a reflujo, con agitación y en atmósfera inerte, durante 24 horas.

La suspensión resultante se filtra y el filtrado se evapora a sequedad. El producto crudo resultante se purifica por cromatografía en columna de sílice (solvente de elución: hexano/acetato de etilo 1:1). Se obtienen 87 mg de (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmasta-1,4-dien-3-ona.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 6,50 (1H, d, J = 10 Hz, H-1); 5,93 (1H, d, J = 10 Hz, H-2); 5,80 (1H, s, H-4); 3,61 (2H, m, H-22 y H-23)

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 186,0 (C-3); 168,4 (C-5); 155,3 (C-1); 127,4 (C-2); 123,8 (C-4); 72,3 (C-22); 70,7 (C-23).

IR: 3300 y 1665 cm⁻¹

Ejemplo 7: Obtención de (22S,23S)-22,23-dihidroxi-6α-fluorestigmast-4-en-3-ona.

Se disuelven 220 mg de (22E)-estigmast-4-en-3-ona en 50 ml de acetato de etilo anhidro. Se agregan 0,35 ml de anhídrido acético y 0,05 ml de ácido perclórico acuoso 70%. La solución se agita en atmósfera inerte durante 2 horas, y posteriormente se lava tres veces con 50 ml de agua, a continuación con 50 ml de solución acuosa al 10% de bicarbonato de sodio y finalmente con 50 ml de agua. La fase orgánica se seca y evapora a sequedad. El enol acetato obtenido se disuelve, sin purificación previa, en 50 ml de acetonitrilo anhidro.

A esta solución se le añaden 320 mg de triflato de N-fluoropiridinio, y la mezcla resultante se somete a reflujo bajo atmósfera de argón durante 18 horas.

Finalizada la reacción se evapora el solvente, y el producto crudo se purifica por cromatografía en columna de sílice (solvente de elución: hexano/acetato de etilo 8:2). Se obtuvieron 170 mg de 6α-fluoroestigmast-4-en-3-ona.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 6,02 (1H, s, H-4); 5,15 (2H, m, H-22 y H-23); 5,02 (1H, multiplete doble, J = 42 Hz, H-6).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 199,2 (d, J = 3 Hz, C-3); 166,0 (d, J = 35 Hz, C-5); 129,1 (d, J = 11 Hz, C-4); 137,7 (C-22); 129,8 (C-23).

IR: 3300 y 1680 cm⁻¹

El doble enlace de la cadena lateral del compuesto anterior se dihidroxila de manera similar a la descrita en el Ejemplo 1, obteniéndose 120 mg de (22S,23S)-22,23-dihidroxi-6α-fluorestigmast-4-en-3-ona.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 6,02 (1H, s, H-4); 5,02 (1H, multiplete doble, J = 42 Hz, H-6); 3,61 (2H, m, H-22 y H-23)

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 199,2 (d, J = 3 Hz, C-3); 166,0 (d, J = 35 Hz, C-5); 129,1 (d, J = 11 Hz, C-4); 72,1 (C-22); 70,6 (C-23).

IR: 3300 y 1655 cm⁻¹

Ejemplo 8: Obtención de (22S,23S)-22,23-dihidroxi-6α-fluorestigmasta-1,4-dien-3-ona.

Se tratan 70 mg de (22S,23S)-22,23-dihidroxi-6α-fluorestigmast-4-en-3-ona con DDQ siguiendo la técnica descrita en el Ejemplo 6. Tras la purificación por cromatografía en columna de sílice (solvente de elución: hexano/acetato de etilo 8:2) del producto crudo obtenido, se aíslan 35 mg de (22S,23S)-22,23-dihidroxi-6α-fluorestigmasta-1,4-dien-3-ona.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 7,50 (1H, d, J = 10 Hz, H-1); 6,59 (1H, d, J = 10 Hz, H-2); 6,45 (1H, s, H-4); 5,15 (1H, multiplete doble, J = 42 Hz, H-6); 3,61 (2H, m, H-22 y H-23).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 199,2 (d, J = 3 Hz, C-3); 166,0 (d, J = 35 Hz, C-5); 155,3 (C-1); 129,1 (d, J = 11 Hz, C-4); 127,4 (C-2); 72,1 (C-22); 70,6 (C-23).

IR: 3300 y 1655 cm⁻¹

Ejemplo 9: Obtención de (22S,23S)-6α,22,23-trihidroxiestigmast-4-en-3-ona.

Se disuelven 100 mg de (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona en 15 ml de diclorometano anhidro. Se agregan 55 mg de dióxido de selenio y la mezcla se agita en atmósfera inerte, durante 8 horas.

La suspensión resultante se filtra y el filtrado se evapora a sequedad. El producto crudo resultante se purifica por cromatografía en columna de sílice (solvente de elución: hexano/acetato de etilo 1:2). Se obtienen 87 mg de (22S,23S)-6α,22,23-trihidroxiestigmast-4-en-3-ona.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 5,83 (1H, s, H-4); 4,57 (1H, m, H-6); 3,61 (2H, m, H-22 y H-23)

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 200,1 (C-3); 168,3 (C-5); 126,0 (C-4); 72,3 (C-6); 72,3 (C-22); 70,7 (C-23).

IR: 3300 y 1680 cm^{-1}

Ejemplo 10: Obtención de (22S,23S)-6 α ,22,23-trihidroxiestigmasta-1,4-dien-3-ona.

5 Se tratan 50 mg de (22S,23S)-6 α ,22,23-trihidroxiestigmast-4-en-3-ona con DDQ siguiendo la técnica descrita en el Ejemplo 6. Tras la purificación por cromatografía en columna de sílice (solvente de elución: hexano/acetato de etilo 8:2) del producto crudo obtenido, se aíslan 35 mg de (22S,23S)-6 α ,22,23-trihidroxiestigmasta-1,4-dien-3-ona.

10 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 200 MHz): 7,02 (1H, d, J = 10 Hz, H-1); 6,34 (1H, s, H-4); 6,21 (1H, d, J = 10 Hz, H-2); 4,49 (1H, m, H-6); 3,61 (2H, m, H-22 y H-23).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 50 MHz): 187,3 (C-3); 161,5 (C-5); 154,6 (C-1); 129,5 (C-2); 125,5 (C-4); 72,3 (C-22); 70,7 (C-23); 67,7 (C-6).

15 IR: 3300 y 1680 cm^{-1}

Ejemplo 11: Evaluación de la actividad antiviral *in vitro* de los compuestos I y II

20 La actividad anti-VHS-1 de los compuestos I y II fue evaluada en células de conjuntiva humana (IOBA-NHC). En primer lugar, se determinó la citotoxicidad de los mismos para las células IOBA-NHC usando el ensayo colorimétrico con MTT, basado en el clivaje de la sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, para proporcionar un producto azul, formazán (Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Journal of Immunological Methods 1986;89:271-77). Los compuestos disueltos en etanol se agregaron a monocapas confluentes de células IOBA-NHC crecidas en microplacas de 96 pocillos, en concentraciones de hasta 600 μM , según el compuesto. La concentración de etanol fue inferior a 1%. Tras 24 h de incubación a 37°C, se leyó la absorbancia de cada pocillo a 570 nm, con una longitud de onda de referencia de 630 nm. Se determinó la concentración citotóxica 50% (CC_{50}) como la concentración de compuesto que reduce la absorbancia al 50% respecto del control sin tratar (Tabla 1).

30 Para evaluar la actividad antiviral de los compuestos I y II, monocapas de células IOBA-NHC crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con la cepa KOS de VHS-1 a una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,2, y tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos. Células infectadas y sin tratar fueron utilizadas como control de la infección. Tras una incubación a 37°C durante 24 h, el virus libre y asociado a células fue recolectado y valorado en células Vero por plaqueo en medio semisólido. Una inhibición de la replicación viral dependiente de dosis se observó en las células tratadas con los compuestos I y II (Tabla 1).

Tabla 1. Citotoxicidad y actividad anti-VHS-1 de los compuestos I y II

	I	II
CC_{50} (μM) ^a	71,2	70,8
CE_{50} (μM) ^b	5,4	17,9
IS ^c	13,2	3,9

40 ^a Concentración citotóxica 50

^b Concentración efectiva 50

^c Índice de selectividad ($\text{CC}_{50}/\text{CE}_{50}$)

45 Los resultados muestran que los compuestos I y II presentan una actividad anti-VHS-1 y, en particular, que el compuesto I es más activo que el II, ya que este último presenta un índice de selectividad mayor.

Ejemplo 12: Estudio *in vivo* de la actividad antiviral y/o antiinflamatoria del compuesto I en un modelo murino de queratitis estromal herpética (QH)

50 Considerando la actividad anti-VHS-1 del compuesto I en células de tejido conjuntival, se decidió evaluar su habilidad para curar la QH en un modelo experimental murino.

55 Se realizó un ensayo de toxicidad *in vivo*. Mediante la observación diaria de grupos de 5 ratones que fueron tratados con el compuesto I, tres veces al día, durante tres días consecutivos, se confirmó la ausencia de efectos tóxicos a una concentración de 40 μM .

60 Para determinar si el tratamiento con el compuesto I, tras la inoculación viral, afectaba los signos de la QH, ratones machos de 6-8 semanas de edad fueron anestesiados con ketamina/xilacina por vía intraperitoneal e infectados con VHS-1 cepa KOS en las córneas derechas, raspadas previamente con aguja. Un grupo de animales fue tratado con solución salina tamponada (PBS) (control de la enfermedad), mientras que los otros fueron tratados tópicamente con una concentración de 40 μM del compuesto I tres veces al día. Además, se incluyeron grupos de animales controles de la actividad antiviral del aciclovir (ACV) y de la actividad antiinflamatoria de la dexametasona (DEX), ambos

fármacos de uso comercial.

Se determinó tanto la incidencia de la enfermedad como el grado de gravedad de las lesiones y la evolución de la QH fue determinada bajo lupa a lo largo de 15 días. El diagnóstico de la enfermedad está basado en la densidad de los infiltrados inflamatorios, alargamiento de los vasos con invasión corneal (neovascularización), y la presencia de úlceras superficiales. Por lo tanto, los ratones que presentaron párpados hinchados (blefaritis), neovascularización en más de un 10% de la superficie corneal, y opacidad corneal con o sin signos de necrosis, fueron considerados enfermos de QH.

Los signos de enfermedad ocular se desarrollan gradualmente a partir de los días 6-7 posinfección (p.i.) y se registró el porcentaje de animales con QH y la gravedad de los signos de la enfermedad en los días 3, 8, y 15 p.i (Figuras 1 y 2).

Para evaluar la actividad antiviral del compuesto I, el compuesto fue aplicado a un grupo de animales los días 1, 2 y 3 p.i., días en los cuales se produce la multiplicación de VHS-1 en la córnea. Asimismo, otros grupos de ratones fueron tratados con ACV -como control positivo de actividad antiviral- y con la DEX.

El 90% de los ratones infectados sin tratar exhibían lesiones de queratitis en el día 8 p.i., en tanto que sólo el 30% de los ratones tratados con el compuesto I evidenciaba signos de queratitis en el día 8 p.i., mientras que un 10% de los animales tratados con ACV estaba enfermo (Figura 1A). Todos los ratones tratados con DEX enfermaron con QH (Figura 1A). Al finalizar el período de enfermedad, la incidencia de la QH en los animales tratados con el compuesto I o con ACV resultó similar (40 y 30%, respectivamente) (Figura 1A). La magnitud del daño se correlacionó con la incidencia de la QH, encontrando diferencias significativas entre la gravedad de las lesiones correspondientes a los ratones infectados sin tratar y la de los animales infectados y tratados tanto con ACV como con el compuesto I (Figura 1B).

Para evaluar la actividad antiinflamatoria del compuesto I, el compuesto fue aplicado los días 6, 7 y 8 p.i., momento a partir del cual se manifiesta la QH.

Los signos de QH se redujeron significativamente en el grupo tratado con el compuesto I a partir del día 6 p.i., con respecto a los animales sin tratar, ya que sólo un 30% de los ratones presentaba signos de la enfermedad el día 8 p.i. y un 40% el día 10 p.i. (Figura 2A). Dichos porcentajes resultaron similares en el caso del tratamiento con un antiinflamatorio como la DEX, mientras que, como era de esperar, el ACV no tuvo efecto alguno en la mejoría de los signos de la enfermedad (Figura 2A). Asimismo, la gravedad de los signos de queratitis fue menor en los animales tratados tanto con el compuesto I como con la DEX respecto del control de la infección y del correspondiente al tratamiento con ACV (Figura 2B).

Conclusiones

Los compuestos sintéticos denominados compuestos I y II, conservan la estructura a la cual se le adjudica la actividad antiviral (cadena lateral) e incorporan estructuras similares a las de ciertos esteroides con conocida actividad antiinflamatoria. Dichos compuestos han demostrado ser eficaces en el tratamiento de la QH murina. Ambos compuestos presentaron actividad antiviral *in vitro* (Tabla 1). Para realizar los ensayos *in vivo*, se seleccionó el compuesto I por presentar un mayor índice de selectividad, lo cual significa que es más activo que el compuesto II (Tabla 1).

El compuesto I mejoró los signos clínicos y la gravedad de las lesiones de la QH cuando fue administrado al día 6 p.i. (Figura 2) y, por tanto, dicho compuesto impidió la inflamación estromal mediada por la respuesta inmunitaria. El compuesto I mantiene la cadena lateral dihidroxilada de los brassinoesteroides, y presenta en su estructura los anillos A y B de la cortisona. El agregado del grupo ceto en 3 y del doble enlace 4-5 le confiere a la molécula una actividad antiinflamatoria *in vivo* semejante a la de la dexametasona. Esto se observa en el tratamiento de la QH tras la topicación de los animales una vez producida la aparición de las lesiones. Además, el compuesto I presenta la ventaja adicional de mejorar la enfermedad cuando es agregado los primeros 3 días p.i. al igual que el ACV (Figura 1), en tanto que la dexametasona favorece una mayor replicación viral y una exacerbación de los signos de la QH.

Por lo tanto, resulta así demostrado que la presente invención proporciona nuevos compuestos eficaces para tratar la QH, los cuales presentan actividad tanto antiviral como antiinflamatoria.

Ejemplo 13: Estudio *in vitro* de la actividad antiviral y/o antiinflamatoria del compuesto I cuando es aplicado a una estirpe celular de epitelio de conjuntiva humana normal (IOBA-NHC) infectada con adenovirus (ADV-5).

El Compuesto 1 presenta una actividad antiviral contra los adenovirus. Mediante cultivos de una estirpe celular de epitelio de conjuntiva humana normal denominada IOBA-NHC, infectados con adenovirus (ADV-5), a una multiplicidad de infección de 1 y tratados con diferentes concentraciones del compuesto I, los inventores de la presente invención han podido demostrar que dicho compuesto inhibe la replicación de este virus de manera dependiente a la concentración de compuesto utilizada (Figura 3).

El índice de selectividad antiviral del Compuesto I para el adenovirus es de 31,6. Dicho índice fue determinado como cociente entre su actividad viral (=63,2) sobre su citotoxicidad (=2).

5 Asimismo, el Compuesto I posee actividad anti-inflamatoria. Mediante cultivos de una estirpe celular de células inflamatorias (macrófagos) denominada J774, tratadas con un agente que produce inflamación (LPS) y con diferentes concentraciones del Compuesto I, los inventores de la presente invención han podido demostrar que dicho compuesto inhibe la producción de TNF-alfa en cultivos de dicha estirpe celular. Los datos que evidencian dicha conclusión se muestran en la figura 4.

10 **Ejemplo 14: Estudio *in vitro* de la actividad antiviral y/o antiinflamatoria del compuesto II cuando es aplicado a una estirpe celular de epitelio de conjuntiva humana normal (IOBA-NHC) infectada con adenovirus (ADV-5).**

15 El Compuesto II presenta una actividad antiviral contra adenovirus. Mediante cultivos de una estirpe celular de epitelio de conjuntiva humana normal denominada IOBA-NHC infectada con adenovirus (ADV-5), a una multiplicidad de infección de 1 y tratados con diferentes concentraciones del compuesto II, los inventores de la presente invención han podido demostrar que dicho compuesto inhibe la replicación de este virus de manera dependiente a la concentración de compuesto utilizada (Figura 5).

20 El índice de selectividad antiviral del Compuesto II para el adenovirus es de 15,67. Dicho índice fue determinado como cociente entre su actividad viral (=62,6) sobre su citotoxicidad (=4).

25 Además, dicho Compuesto II presenta una actividad antiinflamatoria. Mediante una estirpe celular de células inflamatorias (macrófagos) denominada J774 tratadas con un agente que produce inflamación (LPS) y con diferentes concentraciones del Compuesto II, los inventores de la presente invención han demostrado que dicho compuesto inhibe la producción de TNF-alfa en los cultivos de macrófagos. Los datos que evidencian dicha conclusión se representan en la figura 6.

30 **Ejemplo 15: Ejemplos de composiciones farmacéuticas de uso oftálmico de acuerdo con la invención.**

Las composiciones farmacéuticas de uso oftálmico que comprenden los compuestos de la invención han demostrado ser eficaces a partir de una concentración de 2 mg/100 ml. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de uso oftálmico de acuerdo con la invención pueden contener de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/ml.

35 Solución de uso oftálmico que puede ser administrada en forma de gotas

40 Los ejemplos de soluciones de uso oftálmico para ser administradas en forma de gotas que contienen uno o más de los compuestos de la invención pueden ser aquellas en forma de solución estéril acuosa u oleosa, las cuales opcionalmente pueden contener conservantes antimicrobianos, tales como el cloruro de benzalconio. Dichas soluciones pueden estar en forma de monodosis o multidosis. Preferentemente, aquellas en forma de monodosis no contendrán conservantes antimicrobianos. Dichas soluciones deben poseer una viscosidad de aproximadamente 3-7 centistokes, un pH de aproximadamente 5,8 a 7,2 y una osmolaridad de aproximadamente 290 a 310 mosm/kg. El experto en la materia sabrá seleccionar los excipientes adecuados para que la solución oftálmica no resulte tóxica ni irritante para la conjuntiva y la córnea cuando sea instilada sobre la superficie ocular.

45 Gotas oftálmicas en forma de suspensión

50 Los ejemplos de suspensiones oftálmicas para ser administradas en forma de gotas que contienen uno o más de los compuestos de la invención pueden ser aquellas en forma de suspensión estéril acuosa, que opcionalmente pueden contener conservantes antimicrobianos, tales como el cloruro de benzalconio. Dichas soluciones pueden estar en forma de monodosis o multidosis. Preferentemente, aquellas en forma de monodosis no contendrán conservantes antimicrobianos. Preferentemente, dicha suspensión deberá contener Tiloxapol o algún excipiente similar para permitir que los compuestos de la invención se mantengan en suspensión durante un tiempo adecuado

55 Las suspensiones acuosas que contienen uno o más compuestos de acuerdo con la invención deben presentar una viscosidad de aproximadamente 3-7 centistokes, un pH de aproximadamente 5,8 a 7,2 y una osmolaridad de aproximadamente 290 a 310 mosm/kg. El experto en la materia sabrá seleccionar los excipientes adecuados para que la solución oftálmica no resulte tóxica ni irritante para la conjuntiva y la córnea, cuando sea instilada sobre la superficie ocular.

60 Lociones oftálmicas

65 Las lociones oftálmicas que contienen uno o más de los compuestos de la invención deben ser estériles y pueden ser utilizadas para lavados oculares o para impregnación de los compuestos de la invención en la superficie ocular.

5 Los ejemplos de lociones oftálmicas que contienen uno o más de los compuestos de la invención pueden ser aquellas en forma de loción estéril acuosa, que opcionalmente pueden contener conservantes antimicrobianos, tales como el cloruro de benzalconio. Dichas lociones pueden estar en forma de monodosis o multidosis. Preferentemente, aquellas en forma de monodosis no contendrán conservantes antimicrobianos. El experto en la materia sabrá seleccionar los excipientes adecuados para que dicha preparación oftálmica no resulte tóxica ni irritante para la conjuntiva y la córnea cuando ésta sea instilada sobre la superficie ocular.

10 Las lociones acuosas que contienen uno o más compuestos de acuerdo con la invención deben presentar una viscosidad de aproximadamente 3-7 centistokes, un pH de aproximadamente 5,8 a 7,2 y una osmolaridad de aproximadamente 290 a 310 mosm/kg. El experto en la materia sabrá seleccionar los excipientes adecuados para que la loción oftálmica no resulte tóxica ni irritante para la conjuntiva y la córnea cuando sea administrada sobre la superficie ocular.

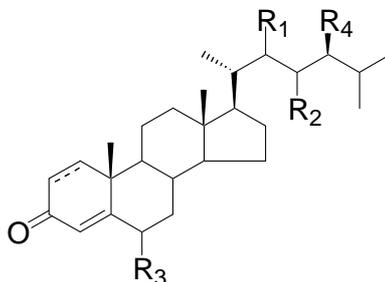
15 Preparaciones semisólidas oftálmicas

Las preparaciones semisólidas que contienen uno o más compuestos de acuerdo con la presente invención serán estériles en forma de ungüentos, cremas o geles, los cuales se aplicarán sobre la conjuntiva. Dichas preparaciones pueden contener una o más sustancias solubles que logren una distribución y aspecto homogéneos. El experto en la materia podrá seleccionar los excipientes adecuados de manera que dicha preparación oftálmica no resulte tóxica ni irritante para la conjuntiva y la córnea cuando sea administrada sobre la superficie ocular.

20 Deben considerarse unas condiciones similares en la preparación de insertos oftálmicos y de preparaciones oftálmicas intraoculares.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto según la fórmula estructural siguiente:



5

en la que

10 R_1 y R_3 se seleccionan de entre H, HO-, R_5 -O-, HCOO-, R_5 -COO-, -OOC- R_6 -COO-, p-tolueno sulfonato, fosfato, tartrato, maleato, sulfato, flúor, cloro, bromo, yodo y metanosulfonato,

R_2 se selecciona de entre H, HO-, R_5 -O-, HCOO-, R_5 -COO-, -OOC- R_6 -COO-, p-tolueno sulfonato, fosfato, tartrato, maleato, sulfato, flúor, cloro, bromo, yodo,

15 o - R_1 y - R_2 pueden ser conjuntamente -O-,

R_4 y R_5 se seleccionan de entre H y alquilo C_1 - C_4 de cadena lineal o ramificada,

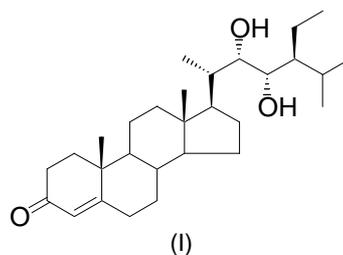
20 R_6 es $-(CH_2)_n-$ en la que n es igual a 1, 2 o 3, y,



puede ser un enlace simple o doble

para su utilización en el tratamiento de los adenovirus y las enfermedades inflamatorias.

25 2. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que presenta la fórmula estructural (I) siguiente:



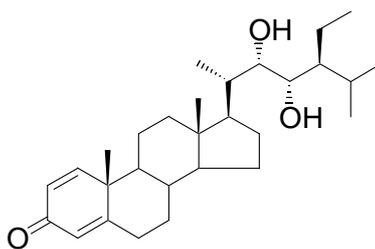
30 en la que las configuraciones de los átomos de carbono C22 y C23 unidos respectivamente a los sustituyentes HO son S para ambos átomos de carbono,

para su utilización en el tratamiento de los adenovirus.

35 3. Compuesto caracterizado por que es seleccionado de entre:

(22S,23S) -22,23-dihidroxicolest-4-en-3-ona
 (22S,23S) -22,23-dihidroxiergost-4-en-3-ona
 (22S,23S) -22,23-dihidroxi-6 α -fluoroestigmast-4-en-3-ona,
 (22S,23S) -22,23-dihidroxi-6 α -fluoroestigmasta-1,4-dien-3-ona,
 (22S,23S) -6 α -22,23-trihidroxiestigmast-4-en-3-ona,
 (22S,23S) -6 α -22,23-trihidroxiestigmasta-1,4-dien-3-ona, y
 compuesto de la fórmula estructural (II) siguiente:

40



en la que las configuraciones de los átomos de carbono C22 y C23 unidos respectivamente a los sustituyentes HO son S para ambos átomos de carbono.

5

4. Composición farmacéutica oftálmica caracterizada por que comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/ml del compuesto que presenta la fórmula estructural (I) como se definió en la reivindicación 2, en la que las configuraciones de los átomos de carbono C22 y C23 unidos respectivamente a los sustituyentes HO son S para ambos átomos de carbono, y excipientes farmacéuticamente aceptables.

10

5. Compuesto según la reivindicación 3, para su utilización como un medicamento.

6. Compuesto según la reivindicación 3 o 5, para su utilización en el tratamiento del virus herpes simple tipo 1 (VHS-1).

15

7. Composición farmacéutica caracterizada por que comprende el compuesto según la reivindicación 3 o 5, y excipientes farmacéuticamente aceptables.

20

8. Composición farmacéutica oftálmica caracterizada por que comprende el compuesto que presenta la fórmula estructural (II) como se define en la reivindicación 3, en la que las configuraciones de los átomos de carbono C22 y C23 unidos respectivamente a los sustituyentes HO son S para ambos átomos de carbono, y excipientes farmacéuticamente aceptables.

25

9. Composición farmacéutica oftálmica según la reivindicación 4 u 8, caracterizada por que se encuentra en forma líquida o semisólida.

10. Composición farmacéutica oftálmica según cualquiera de las reivindicaciones 4, 8 o 9, caracterizada por que es seleccionada de entre una solución, suspensión, loción, formulación semisólida, inserto, gel y una preparación intraocular.

30

11. Composición farmacéutica oftálmica según la reivindicación 10, caracterizada por que comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/ml del compuesto de fórmula estructural (I) o (II), en la que las configuraciones de los átomos de carbono C22 y C23 unidos respectivamente a los sustituyentes HO son S para ambos átomos de carbono, y excipientes farmacéuticamente aceptables.

35

12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, para su utilización en el tratamiento de la queratoconjuntivitis epidémica.

40

13. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, para su utilización en el tratamiento de la queratitis estromal herpética (QH).

Figura 1A

1A

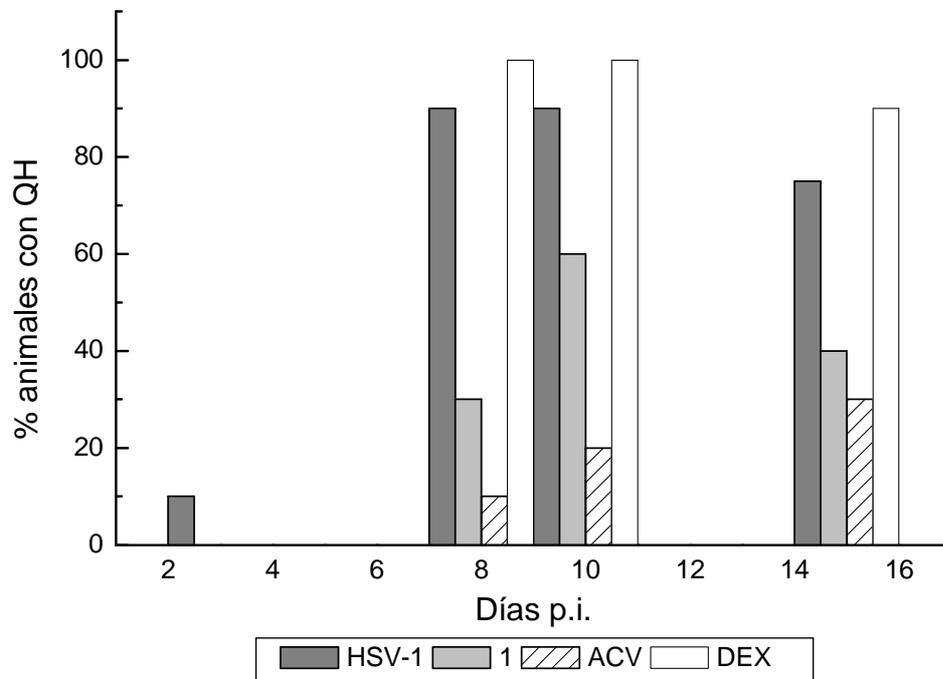


Figura 1: Efecto del compuesto I en la evolución de la enfermedad ocular inducida por VHS-1 en ratones tratados los días 1, 2 y 3 p.i.

A) incidencia de QH.

Figura 1B

1B

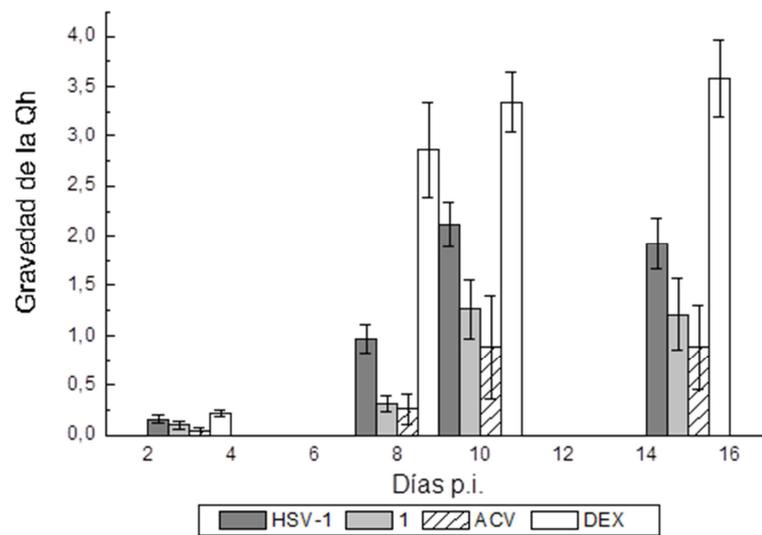


Figura 1: Efecto del compuesto I en la evolución de la enfermedad ocular inducida por VHS-1 en ratones tratados los días 1, 2 y 3 p.i.

B) Gravedad de las lesiones.

Figura 2A

2A

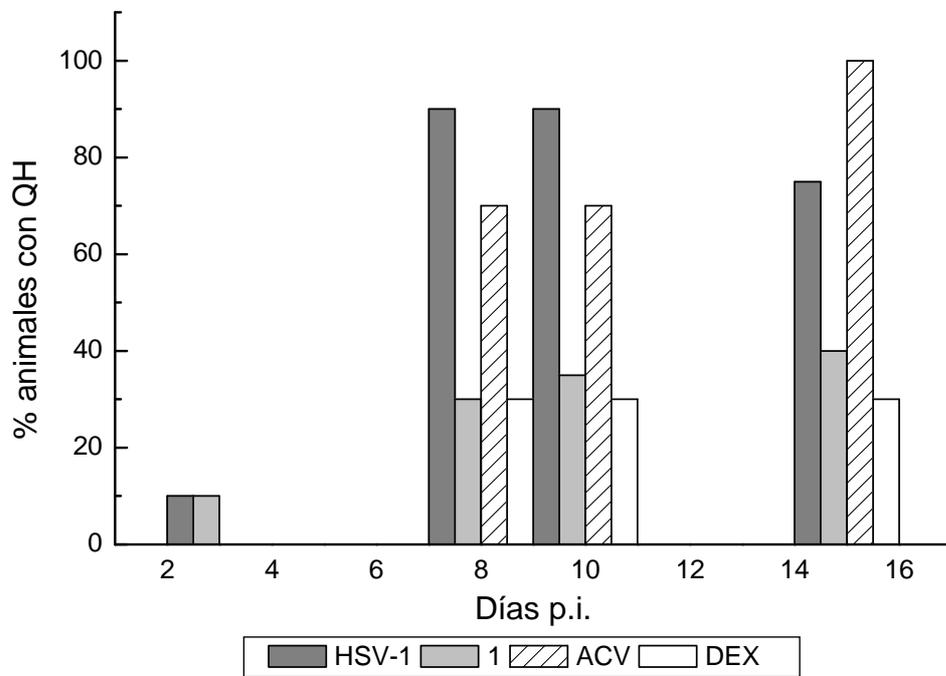


Figura 2: Efecto del compuesto I en la evolución de la enfermedad ocular inducida por VHS-1 en ratones tratados los días 6, 7 y 8 p.i.
A) incidencia de QH.

Figura 2B

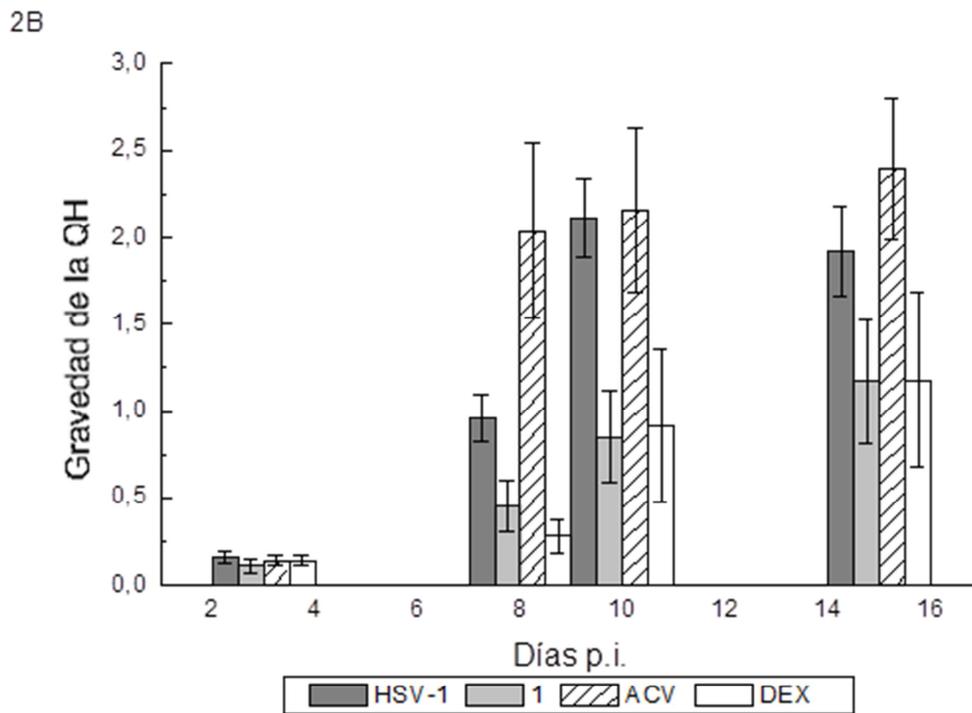


Figura 2: Efecto del compuesto I en la evolución de la enfermedad ocular inducida por VHS-1 en ratones tratados los días 6, 7 y 8 p.i.

B) Gravedad de las lesiones.

Figura 3

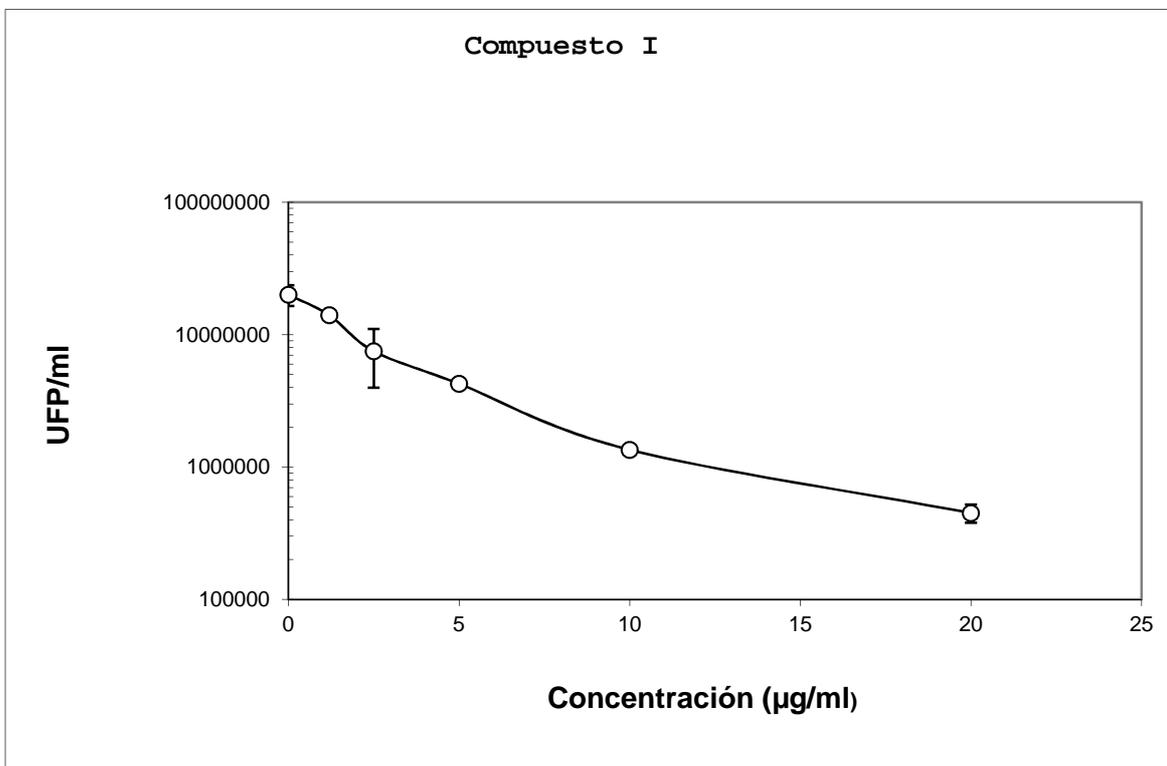


Figura 4

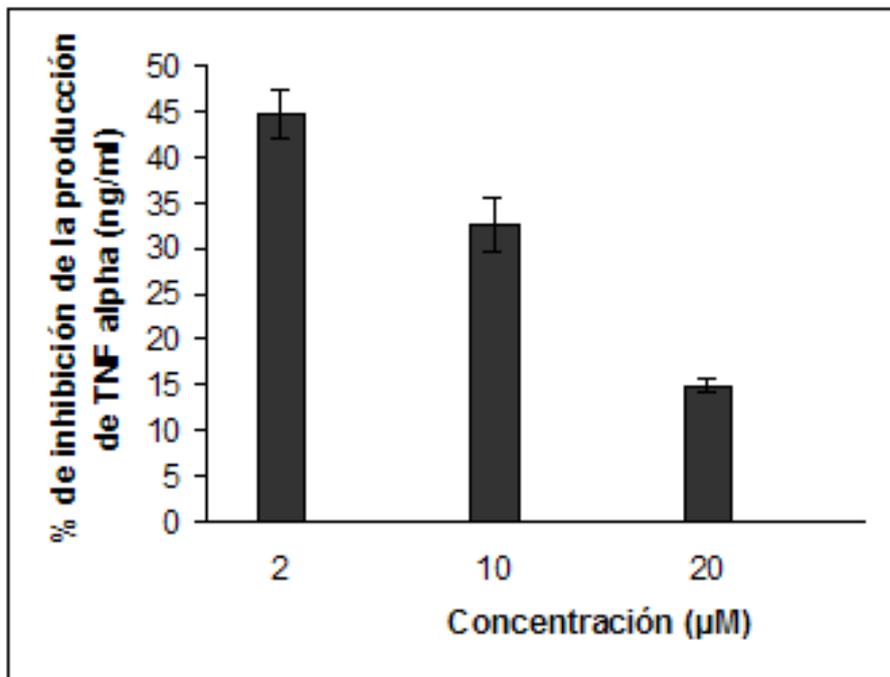


Figura 5

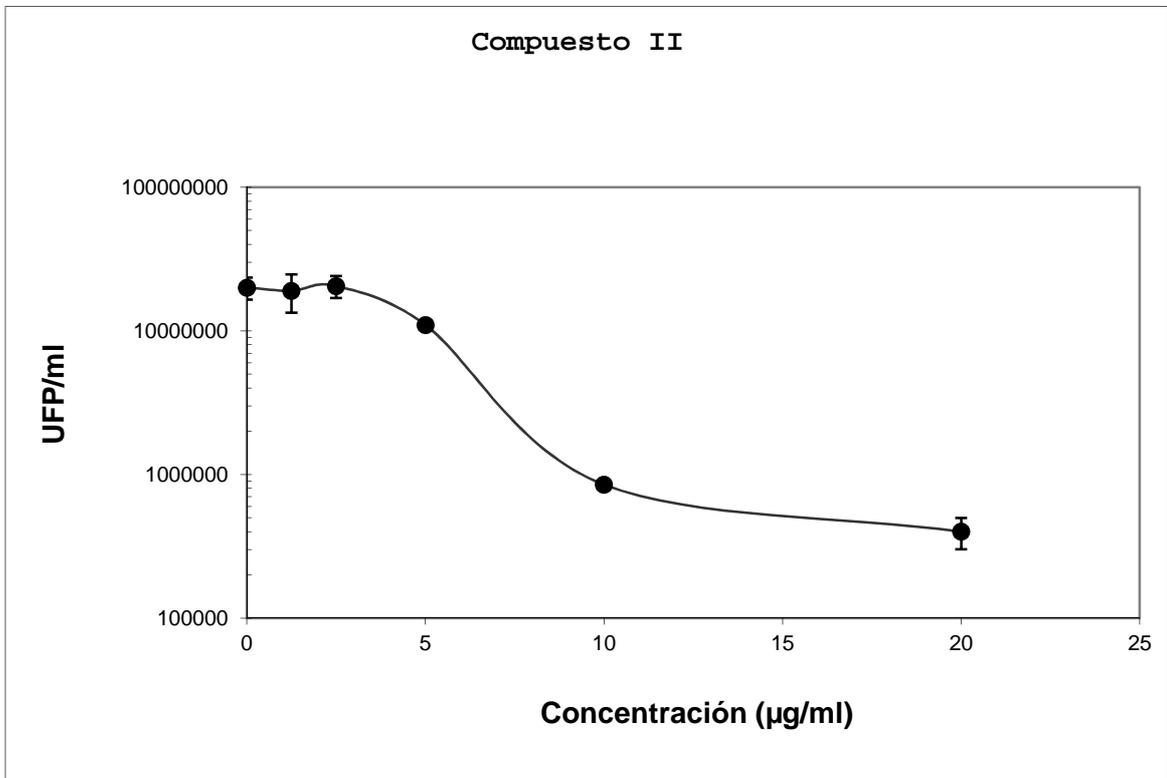


Figura 6

