

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 505**

21 Número de solicitud: 201530320

51 Int. Cl.:

C07C 39/17 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

12.03.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.10.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2016/070164

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA ESTUDI GENERAL
(80.0%)**

Avda. Blasco Ibáñez, 13

46010 Valencia ES y

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUÍA (20.0%)

72 Inventor/es:

GONZÁLEZ CARDENETE, Miguel Ángel y

BETANCUR GALVIS, Liliana Amparo

74 Agente/Representante:

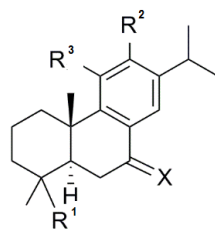
CUETO PRIEDE, Sénida Remedios

54 Título: **ANÁLOGOS DE FERRUGINOL COMO AGENTES ANTIVIRALES**

57 Resumen:

Análogos de ferruginol como agentes antivirales

La presente invención se refiere a un análogo de ferruginol de fórmula (I)



(I)

en la que R¹, R², R³ y X tienen independientemente el significado siguiente:

- R¹ es CH₂-ftalimido, CH₂-succinimido, CH₂-maleimido, CH₂-NHCOCH₃, CH₂-NHCOCF₃, CHO, CH₂OH, (C₁-C₆)carboxiester, o CH₃ y donde R¹ tiene cualquier estereoquímica,

- R² es H, OH, F, Cl, Br, NO₂, NH₂, (C₁-C₆)alquilamino, di(C₁-C₆)alquilamino, (C₁-C₆)alquilamida o di(C₁-C₆)alquilamida,

- R³ es H o OH,

- X es H₂, O, OH o NOH, donde X puede tener cualquier estereoquímica en el caso apropiado, como cuando es OH,

incluyendo cualquier estereoisómero, para su uso como antiviral, especialmente para su uso contra virus envueltos, y de forma especialmente preferida contra el virus del dengue y herpes.

(G) DENV-2

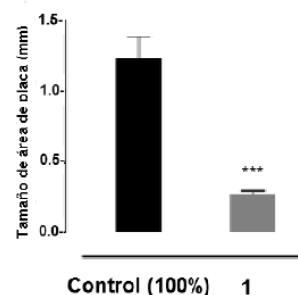


FIG. 1

ES 2 586 505 A1

DESCRIPCIÓN

ANÁLOGOS DE FERRUGINOL COMO AGENTES ANTIVIRALES

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos antivirales derivados de abietanos, específicamente compuestos análogos de ferruginol, para su uso contra virus de las familias *Flaviviridae* y *Herpesviridae*, principalmente contra los diversos serotipos del virus del dengue (DENV 1-4) y los herpesvirus humanos tipo 1 (HHV-1) y tipo 2 (HHV-2).

10 **Antecedentes de la invención**

El virus dengue (DENV), es un virus envuelto en cuya superficie se encuentra la proteína de envoltura (E) la cual actúa como ligando para unirse a los receptores celulares durante la infección celular. Su genoma es una cadena sencilla de RNA, la cual codifica para una única poliproteína que tras ser clivada por proteasas virales y celulares dará lugar a 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales importantes para el proceso replicativo. Hasta la fecha se han descrito cuatro serotipos (DENV-1 a DENV-4).

El DENV es transmitido por mosquitos hembra del género *Aedes* (especies *aegypti* y *albopictus*). Epidemiológicamente es la arbovirosis más abundante alrededor del mundo, ya que se encuentran circulando cada vez con menos restricciones ecológicas, tanto el virus como el vector, en más de cien países del cinturón tropical y cercanos al trópico, tanto del Viejo como del Nuevo Mundo; causando un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde dengue con o sin signos de alarma hasta dengue severo, el cual puede ser mortal debido a que altera la permeabilidad capilar e induce extravasación del plasma. Además, existen reportes de la enfermedad con manifestaciones inusuales, tales como cardiomiopatía, insuficiencia hepática y trastornos neurológicos. El impacto en la salud pública de esta enfermedad aumenta, ya que en la actualidad no existen medicamentos aprobados para su tratamiento en humanos, no hay vacuna disponible para la profilaxis y al ser un virus con genoma de RNA, con una elevada tasa de mutación, no resulta ser una buena alternativa la creación de medicamentos antivirales contra genes o proteínas virales específicas, puesto que frecuentemente se seleccionarían mutantes virales con resistencia a los fármacos. En este contexto, resulta necesario buscar en las células hospedadoras infectadas, blancos celulares y/o moleculares importantes en el proceso de replicación viral que sean modulables por fármacos, agentes o principios activos que sean efectivos, no tóxicos a bajas dosis y eviten la aparición de resistencia. Por tal motivo, recientemente se ha planteado una estrategia en la búsqueda de nuevos antivirales, dirigida específicamente hacia proteínas celulares empleadas específicamente por el virus durante su ciclo replicativo, importantes y claves dentro de éste, que no afecten de manera directa el metabolismo celular de células no infectadas, con una baja tasa de mutación y resistencia a nuevos fármacos (Martínez-Gutiérrez et al., 2011).

Los herpesvirus humanos tipo 1 y tipo 2 (HHV-1 y HHV-2), son virus envueltos con DNA de cadena doble, los cuales producen lesiones principalmente a nivel de la cavidad oral y genital; adicionalmente, ejercen latencia en neuronas sensoriales, causando periodos de reactivación de la infección durante toda la vida del hospedador. Si bien esta enfermedad y sus recidivas, suelen ser autolimitadas en individuos inmunocompetentes, algunas complicaciones severas pueden ocurrir de manera frecuente, tales como, queratoconjuntivitis, meningitis y encefalitis, particularmente en recién nacidos y en personas inmunocomprometidas tales como individuos trasplantados e inmunodeficientes.

Aunque en la actualidad se disponen de medicamentos para el tratamiento de las infecciones herpéticas primarias y recurrentes, como el aciclovir (ACV) y sus análogos, aún no hay vacuna disponible para prevenir la infección por estos virus. Adicionalmente, mutaciones en las enzimas virales timidina quinasa y DNA polimerasa, pueden generar cepas resistentes a los antivirales de uso común. Como consecuencia, la prevalencia de cepas resistentes al ACV en pacientes inmunocomprometidos (4-7%) y trasplantados (14-30%), ha complicado su manejo clínico (Stranska et al., 2005; Bacon et al., 2003).

En pacientes inmunocomprometidos el herpes puede manifestarse de manera poco habitual y con mayor índice de recurrencias; en estos individuos la aparición de vesículas herpéticas es un cofactor para la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), dada la exposición de la piel cuando se rompen las vesículas herpéticas. Es conocido que existe un sinergismo entre el HHV y HIV (Nagot et al., 2007). De los herpesvirus humanos, el HHV-2 es el agente causal más común de úlceras genitales en el

mundo, el cual se detecta en el 60-90% de las personas que viven con el virus de Inmunodeficiencia Humana/Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (HIV/AIDS). Las manifestaciones clínicas en individuos HIV-1 positivos pueden variar desde síntomas genitales leves hasta úlceras genitales severas. Estudios de laboratorio y epidemiológicos sugieren que la infección por el HHV-2 puede incrementar la susceptibilidad a la infección por el HIV-1. De hecho, proteínas codificadas por el HHV-2 se unen al DNA integrado del HIV-1 en células coinfectadas y promueven la transcripción directa del HIV-1, además, la reactivación asintomática o sintomática del HHV-2 produce un aumento de la carga viral en sangre y en tracto genital del HIV-1 (Schacker et al., 2002); adicionalmente, el riesgo de transmisión del HIV-1 se aumenta 4 veces en personas con enfermedad de úlcera genital sintomática causada por HHV-2. Así mismo, es de notar que la terapia para HHV-2 durante 8-12 semanas reduce significativamente los niveles de carga viral del HIV-1 en 2.5 a 5 copias/mL (Nagot et al., 2007).

En cuanto a lo anterior, a partir de las evidencias científicas dadas por diversos casos clínicos, *Bermejo et al., Dermatol. Argent. 17(1):52-56 (2011)* describe las observaciones clínicas de pacientes inmunocomprometidos, ya sea por HIV o por el uso de terapias supresoras para el tratamiento de enfermedades ampollares autoinmunes, que se asocian con HHV, hasta concluir que los complejos cambios que conllevan a la inmunodepresión a partir del HIV tales como la reducción del número de linfocitos T CD4, entre otras, favorecen la replicación del HHV (Nagot et al., 2007). Esto se traduce en un aumento del número de recidivas, la duración de las mismas y la posibilidad de diseminación. Aunque parece que la inmunidad mediada por células T es esencial para mantener bajo control al HHV, la infiltración y persistencia de los linfocitos T CD4, así como de otras células inflamatorias en el sitio de inflamación causada por las vesículas herpéticas, brinda, de hecho, el medio ideal para sobreinfectar a los linfocitos T CD4 con diversos genotipos del HIV y mejorar así la replicación del HIV. Las células T CD4 que infiltran el sitio de la lesión por HHV tienen una alta expresión de CCR5, en la proximidad de células dendríticas que expresan CD123, receptor capaz de transferir el virus del HIV a las células T CD4 sanas. Esto podría representar una mayor replicación local del HIV y un riesgo para la diseminación sistémica del mismo, lo que tal vez depende de la extensión y duración de la inflamación local provocada por la inmunidad del paciente. El virus de Inmunodeficiencia Humana, además, es capaz de modificar la forma de presentación de las infecciones herpéticas, dando lugar a la aparición de modalidades clínicas poco clásicas. (Nagot et al., 2007). La interacción entre los virus del HHV- 1 y HHV- 2 y el HIV-1 constituye un importante problema de salud para nuestros países y para el mundo, debido a que podrían aumentar la incidencia del SIDA a partir de casos infectados con herpesvirus humanos. Estos hallazgos en conjunto sugieren que en individuos seropositivos para HIV, la coinfección HIV/HHV-2 es muy común y que el control de la infección por el HHV-2 a través de antivirales antiherpéticos, puede reducir la susceptibilidad a la transmisión de la infección por el HIV-1 contribuyendo así con la disminución de la pandemia del HIV/SIDA.

Dado lo anterior, el tratamiento antiherpético puede acelerar el proceso de curación, reducir el dolor y retrasar o prevenir brotes recurrentes. Habitualmente, el tratamiento se utiliza sólo durante el brote. Esto se llama "terapia episódica." En las personas con el sistema inmunológico debilitado e inmunocomprometido, los brotes suelen ser muy frecuentes y requieren de un tratamiento a largo plazo para prevenir las recurrencias. Esto se llama "terapia supresiva". Actualmente, hay diversas terapias disponibles para el tratamiento del herpes (AISMED, 2013) entre estas:

1. 2-amino-9-(2-hidroxi-etoximetil)- 1H-purin-6-ona. (Aciclovir): Ha sido estudiado y usado durante muchos años como tratamiento para el herpes oral y genital y ha mostrado ser seguro y efectivo. El Aciclovir está disponible en cremas tópicas, pastillas y en formulación intravenosa. La mayoría de los expertos acuerdan que la crema no es muy efectiva y que las pastillas son mejores para los brotes leves a moderados, o para la terapia supresiva a largo plazo. El Aciclovir intravenoso se usa para tratar los brotes severos o para los episodios en que los órganos internos están afectados (especialmente, la infección del HHV en el sistema nervioso central). La dosis oral usada para tratar los brotes es de 400 mg tres a cuatro veces al día, generalmente por 7 a 10 días. Esta dosis se puede duplicar si las vesículas herpéticas no responden al tratamiento. Tomar 400 mg del medicamento tres veces al día ó 800 mg del medicamento dos veces por día, por períodos más prolongados de tiempo, podría prevenir las reactivaciones de los brotes. Pero por lo general, esto se recomienda sólo en pacientes que tienen historia de reactivaciones frecuentes. A las personas que reciben aciclovir intravenoso se le debe controlar la función renal al menos una vez por semana durante el tratamiento intravenoso.

2. Valaciclovir (Valtrex): Valaciclovir es una "pro-droga" de Aciclovir y ha sido específicamente aprobada para el tratamiento del herpes en las personas HIV positivas. A diferencia de aciclovir, el

valaciclovir necesita ser procesado en la célula por la enzima valaciclovir hidroxilasa que lo transforma en aciclovir y valina, para generar su ingrediente activo (aciclovir) (Li et al., 2008). Esto hace que cantidades mayores de aciclovir estén presentes en el sitio de acción que es intracelular, permitiendo de este modo una menor dosis oral (por boca), durante la medicación. Para brotes herpéticos leves a moderados, valaciclovir se medica por vía oral solamente una vez al día (1000 mg todos los días). Para la terapia episódica, valaciclovir se toma durante 7 a 10 días. Sin embargo, el medicamento se puede tomar todos los días por un tiempo más prolongado, utilizando la mitad de la dosis que se necesita para tratar los brotes (500 mg todos los días). Tal como ocurre con aciclovir, valaciclovir raramente causa efectos secundarios.

5
10
15
3. 2-amino-9-[4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)butyl]-1H-purin-6(9H)-one (Penciclovir): Es un fármaco antiviral análogo de guanosina utilizado para el tratamiento de diversas infecciones por herpesvirus, presenta baja toxicidad y buena selectividad. Debido a que el penciclovir se absorbe mal cuando se administra por vía oral, se usa más como un tratamiento tópico, y es el ingrediente activo en los medicamentos de herpes labial- Denavir (NDC 0135-0315-52), Vectavir y Fenivir. El famciclovir es un profármaco de penciclovir con una biodisponibilidad oral mejorada. (Mansfield Dale, 2005)

20
4. Famciclovir (Famvir): Es un fármaco antiviral activo por vía oral. Es el análogo 6-deoxilado del penciclovir que se utiliza por vía tópica e intravenosa. Habitualmente, se toma por vía oral 500 mg del medicamento durante 7 a 10 días. La dosis de 250 mg diarios que se toma por períodos más prolongados de tiempo, se considera segura y efectiva como terapia preventiva para las reactivaciones de los brotes herpéticos (Patel, 2002; Mansfield Dale, 2005).

5. 1-[4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-5- (trifluoromethyl) pyrimidine-2,4-dione (Trifluridine): En gotas se usa para el tratamiento de la infección del HHV en los ojos. Se coloca una gota en el ojo afectado, cada dos horas, durante 21 días. No se puede usar para tratar o prevenir la enfermedad del HHV en otras partes del cuerpo.

25
30
35
En algunos casos, los brotes herpéticos no responden al aciclovir, valaciclovir, o famciclovir, probablemente debido al desarrollo de formas del HHV-1 y HHV-2 resistentes a los medicamentos. Se ha visto que los pacientes HIV positivos con un sistema inmunológico debilitado (habitualmente con un recuento de células T menor a 100), que han recibido aciclovir a largo plazo para el tratamiento y prevención de las reactivaciones de los brotes herpéticos, desarrollan resistencia a los medicamentos para el herpes. Debido a que aciclovir es similar a valaciclovir y famciclovir, el simple hecho de cambiar a cualquiera de estos dos medicamentos generalmente no es efectivo. Actualmente, **foscarnet (Foscavir)** que es la base conjugada del ácido fosfonofórmico HOOC-PO₃H₂, es el tratamiento más común para la resistencia herpética a aciclovir. El medicamento se suministra por vía intravenosa (IV), usualmente tres veces al día, a menudo en un medio hospitalario o bajo la estrecha supervisión de una enfermera a domicilio.

40
Las personas que tienen aumentos significativos en su recuento de CD4 debido a la terapia antirretroviral para HIV, a veces tienen menos brotes herpéticos y los brotes se resuelven más rápidamente, sin embargo la eliminación viral ("shedding") puede continuar (Stranska et al., 2005). A través de la presente invención se busca a futuro poder contar con una o varias moléculas análogas del ferruginol con actividad antiherpética que puedan ser postuladas para su estudio y uso ya sea en la terapia episódica o supresiva.

45
Múltiples y convergentes vías mediante las cuales diversos virus (Vaccinia HHV, HBV, HCV, HIV, HTLV, MLV, entre otros) causan alteración del citoesqueleto con diferentes propósitos durante el ciclo viral, han sido reportadas por Taylor et al., *Nat. Rev. Microbiol.* 9(6):427-39 (2011). El citoesqueleto de actina es reorganizado por estos virus que lo utilizan durante el proceso de entrada, morfogénesis y salida de nuevas partículas virales.

50
Las estructuras con contenido de actina y tubulina inducidas durante la infección por herpesvirus, tienen la capacidad de transportar viriones hacia las células adyacentes. De acuerdo con las conclusiones de Dixit et al., *Neuroscience Letters.* 440(2), 113-118 (2008), el HHV-1 promueve reordenamientos del citoesqueleto, lo cual facilita la propagación viral en cultivos de neuronas, incluyendo un aumento dramático en los filopodios. Así mismo, ensayos *in vitro* han permitido identificar las diversas formas en que el virus dengue interactúa con el citoesqueleto de actina. Wang et al., *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 4, 1-11 (2010) demostraron que la dinámica del citoesqueleto es necesaria para los eventos de entrada, producción y liberación de partículas virales, lo que indica un efecto directo de la proteína E sobre las modificaciones estructurales del citoesqueleto de actina.

Considerando que los virus herpes y dengue requieren componentes del citoesqueleto, como los microtúbulos y microfilamentos de actina durante diversas etapas de su ciclo replicativo (principalmente en la entrada, el transporte y la liberación de partículas virales) es posible que los análogos del ferruginol reportados en la presente invención **1** y **2** induzcan la interrupción de estas vías celulares involucradas en la propagación viral.

Aunque no es posible asegurar que algún componente celular o viral participa en nuestros hallazgos, su estudio será un instrumento importante para diseccionar los complejos procesos celulares y moleculares que intervienen durante las infecciones virales por herpesvirus humanos y dengue. Esta invención permitirá la comprensión de algunos de los mecanismos celulares y moleculares donde dos virus muy diferentes como herpes y dengue, posiblemente convergen en una vía evolutiva conservada durante la infección celular, afectando elementos del citoesqueleto, el sistema de endomembranas y cascadas de señalización involucradas en la liberación de partículas virales y en la diseminación de la infección hacia células vecinas.

En los últimos años, diversos estudios han reportado el efecto de algunos compuestos de origen natural en la diseminación célula a célula durante la infección por herpesvirus. Lin et al. (Lin et al., 2011) informaron que el ácido chebulágico y la punicalagina, dos taninos hidrolizables aislados a partir de *Terminalia chebula* (*Combretaceae*), inhiben la diseminación célula a célula de HHV-1, hecho verificado 24 horas después del tratamiento usando un ensayo de placas fluorescentes en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-HHV-1. Por otra parte, Ekblad et al., *Antivir. Chem. Chemother.* 17, 97–106 (2006) reportaron que PI-88, una mezcla de manosa altamente sulfatada que contiene oligosacáridos, redujo el área de las placas de lisis con valores de IC₅₀ de 0,7 µg/mL y 2 µg/mL para HHV-1 y HHV-2, respectivamente.

No obstante, reportes encontrados por nuestro equipo de trabajo de la evidente reducción en el tamaño de la placa viral durante la infección *in vitro* de los virus herpes y dengue por parte de diterpenos, entre estos, el ferruginol y sus análogos, constituye el primer reporte de este tipo de efecto antiviral hasta la fecha.

Los abietanos diterpenoides están ampliamente distribuidos en el reino vegetal presentando un amplio rango de actividades biológicas. El ferruginol, un fenol diterpenoide aislado a partir de plantas pertenecientes a las familias *Podocarpaceae*, *Cupressaceae*, *Lamiaceae* y *Verbenaceae*, exhibe un amplio espectro de actividades biológicas, tales como antibacteriana, antifúngica y antimicrobiana, acaricida, cardioactiva, antioxidante, antiplasmodio, antileishmania y nematicida (González et al., 2012), anticancerígeno, inmunomodulador (Takei et al., 2005), anti-*Acanthamoeba* (Kuzma et al., 2015), antimalarico y antiulcerosa (González et al., 2014), entre otras.

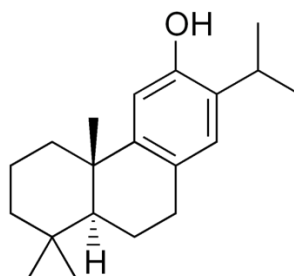
Como antecedentes de la invención, el artículo de González et al., *Tetrahedron.* 68, 9612-9615 (2012) divulga la síntesis del compuesto de fórmula (I) mostrado en esta memoria, en la que R¹ es -CHO, R² es -OH y X es H₂ (compuesto **2** de la presente invención).

El artículo de Malkowsky et al., *Synthesis.* 5: 0773-0778 (2007) divulga derivados abietanos desde el punto de vista de aspectos químicos, en concreto se describe la síntesis del compuesto de fórmula (I) en la que R¹ es un grupo ftalimido, R² es -OH y X es H₂ (compuesto **1** de la invención), sin mencionar ningún tipo de aplicación terapéutica ni actividad biológica de los compuestos análogos de ferruginol.

La actividad antiviral de estos compuestos no ha sido ampliamente investigada en la actualidad, ya que sólo existe un estudio realizado en 2007, donde se demuestra el potencial antiviral de ciertos derivados diterpenoides, entre ellos el ferruginol, durante la infección por un virus RNA envuelto, el Coronavirus (Chih-Chun et al., 2007). Así mismo hasta la fecha, no se ha publicado la actividad antiviral y la eficacia terapéutica del ferruginol y derivados de éste frente a virus DNA y otros RNA, entre éstos no se ha demostrado el potencial antiherpético y anti-DENV.

En la actualidad al no existir tratamiento efectivo para el dengue, se realiza a nivel clínico el seguimiento y manejo de los síntomas causados por éste virus. Es por lo tanto un objeto de la presente invención encontrar nuevos compuestos efectivos en el tratamiento de enfermedades víricas, especialmente frente a los diversos serotipos del virus dengue (DENV1-4). Y en el caso de las infecciones causadas por herpesvirus, se pretende a largo plazo disminuir las dosis actuales de aciclovir en pacientes, y por ende la aparición de cepas resistentes a los análogos de nucleósidos, impactar positivamente en la severidad y frecuencia de recidivas en pacientes inmunocomprometidos, y reducir de manera indirecta la

susceptibilidad a la transmisión de la infección por el HIV-1; lo cual se puede conseguir con los derivados abietanos de la invención. A continuación, se muestra el esquema de la fórmula química del ferruginol.

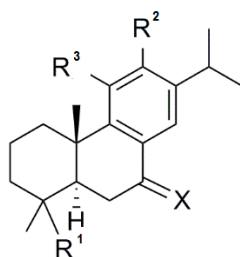


Ferruginol

- 5 La presente invención describe la actividad antiviral: anti-DENV y actividad anti-herpética, tanto en cepas resistentes a los tratamientos existentes como el aciclovir (ACV) como sensibles al ACV; teniendo en cuenta que los HHV causan infección a nivel de la piel y mucosas; de allí que con los derivados tipo abietano, se podrán preparar formas farmacéuticas como cremas tópicas y geles con actividad anti-herpética. De igual manera, se pueden crear formas farmacéuticas sistémicas para tratar ambos virus,
- 10 específicamente el virus dengue. Además, la presente invención tiene como objeto encontrar nuevos candidatos antivirales que actúen sobre dianas celulares y/o moleculares en lugar de actuar en proteínas virales estructurales y no estructurales específicas de los virus, de modo que su acción contra el virus no dependa de la mutabilidad de estas proteínas, especialmente en virus con genoma de RNA como el DENV. Los derivados abietanos sintetizados a partir de deshidroabietilamina de la invención presentan
- 15 excelente actividad contra el virus dengue serotipo 2 (DENV-2) y frente a los herpesvirus humanos tipo 1 (HHV-1) y 2 (HHV-2). Los compuestos más activos tienen una acción sobre el ciclo viral en etapas post-infectivas, y debido a la dramática reducción en el tamaño de las placas de lisis, se considera que su efecto está relacionado con la alteración de algún mecanismo celular implicado en la diseminación de la infección hacia células vecinas.

20 Descripción de la invención

La presente invención se refiere en primer lugar a un compuesto, análogo de ferruginol, de fórmula (I)



(I)

en la que R¹, R² R³ y X pueden tener independientemente el significado siguiente:

- 25 - R¹ puede ser CH₂-ftalimido, CH₂-succinimido, CH₂-maleimido, CH₂-NHCOCH₃, CH₂-NHCOCF₃, CHO, CH₂OH, (C₁-C₆)carboxiester, CH₃ y donde R¹ puede tener cualquier estereoquímica,
- R² puede ser H, OH, F, Cl, Br, NO₂, NH₂, (C₁-C₆)alquilamino, di(C₁-C₆)alquilamino, (C₁-C₆)alquilamida, di(C₁-C₆)alquilamida,
- R³ puede ser H, OH,
- 30 - X puede ser H₂, O, OH, NOH, donde X puede tener cualquier estereoquímica en el caso apropiado, como cuando es OH, incluyendo cualquier estereoisómero, tales como los epímeros e isómeros en la posición 4, con la condición de que no se cumplen las condiciones que den lugar a los compuestos siguientes:
- compuesto de fórmula (I) en la que R¹ es CH₂OH, R² es OH, R³ es OH y X es H₂,

ES 2 586 505 A1

- compuesto de fórmula (I) en la que R¹ es CH₃, R² es OH, R³ es H y X es O,
- compuesto de fórmula (I) en la que R¹ es CH₃, R² es OH, R³ es OH y X es H₂
- compuesto de fórmula (I) en la que R¹ es CH₃, R² es OH, R³ es OH y X es O,

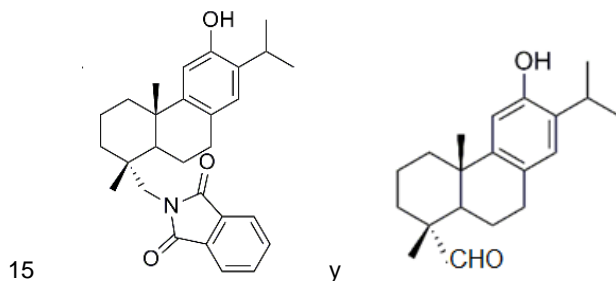
para su uso como antiviral.

- 5 De manera preferente los compuestos, análogos de ferruginol, de fórmula (I) son útiles como medicamento antiviral contra virus envueltos.

- Entre los virus envueltos, los compuestos, análogos de ferruginol, de fórmula (I) de la invención son especialmente útiles contra virus de la familia *Herpesviridae* o *Flaviviridae*. Entre estas familias, los compuestos de fórmula (I) son útiles más preferentemente contra virus de herpes y virus del dengue, y de forma más preferente aún contra las cepas virales HHV-1 y HHV-2 y virus dengue serotipo 2 (DENV-2).
- 10

Los compuestos, análogos de ferruginol, de fórmula (I) de la invención se utilizan de forma preferente en la etapa de post-infección.

Una realización más preferente aún se refiere a un análogo de ferruginol de fórmula (I) seleccionado entre el compuesto **1** y el compuesto **2**, que tienen una fórmula:



- para su uso como antivirales, de modo preferente contra virus envueltos. Entre los virus envueltos, los compuestos **1** y **2** son especialmente útiles contra virus de la familia *Herpesviridae* o *Flaviviridae*. Preferentemente entre los virus de estas familias, los compuestos **1** y **2** son útiles contra virus seleccionados entre virus de herpes y virus del dengue.
- 20

De manera especialmente preferida el uso como antiviral de los compuestos **1** y **2** se refiere a virus seleccionados entre herpes simplex tipo 1 y herpes simplex tipo 2.

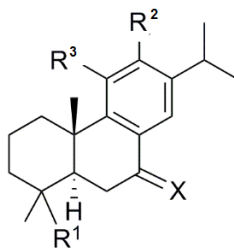
Según una realización adicional especialmente preferida los compuestos **1** y **2** son útiles contra el virus del dengue, especialmente el virus del dengue que pertenece a la cepa DENV-2.

- 25 Los compuestos **1** y **2** de la invención se utilizan de forma preferente en la etapa de post-infección.

Una realización especialmente preferida de la invención es un compuesto de fórmula (I) en la que R¹ es ftalimido, R² es OH, X es H₂- para su uso contra el virus del dengue de tipo DENV-2 (compuesto **1**).

- Una realización adicional especialmente preferida de la invención es un compuesto de fórmula (I) en la que R¹ es -CHO, R² es OH, X es H₂ (compuesto **2**) para su uso contra el virus del dengue serotipo 2 (DENV-2).
- 30

Además, la presente invención tiene también por objeto un compuesto, análogo de ferruginol, de fórmula (II)



(II)

en la que:

R¹ puede ser CH₂-ftalimido, CH₂-succinimido, CH₂-maleimido, CHO, CH₂OH, y donde R¹ puede tener cualquier estereoquímica

- 5 R² puede ser F, Cl, Br, NO₂, NH₂, (C₁-C₆)alquilamino, di(C₁-C₆)alquilamino, (C₁-C₆)alquilamida, di(C₁-C₆)alquilamida

R³ puede ser H, OH

- X puede ser H₂, O, OH, NOH, donde X puede tener cualquier estereoquímica en el caso apropiado, como cuando es OH, e incluyendo los epímeros e isómeros en la posición 4, y con la condición de que no se cumplen las condiciones que den lugar a los compuestos siguientes:

- 10
- compuesto de fórmula (II) en la que R¹ es CH₂OH, R² es OH, R³ es OH y X es H₂
 - compuesto de fórmula (II) en la que R¹ es CH₂OH, R² es Br, R³ es H y X es H₂
 - compuesto de fórmula (II) en la que R¹ es CH₂OH, R² es Br, R³ es H y X es OH
 - compuesto de fórmula (II) en la que R¹ es CH₂OH, R² es NH₂ o N(CH₃)₂, R³ es H y X es H₂

- 15 Los compuestos de fórmula (II) de la invención se pueden preparar mediante reacciones convencionales, que no representan un esfuerzo inventivo para un experto en la materia (reacción de nitración de aromáticos, reducción grupos nitro a amina, reacción de Schiemann y reacción de Sandmeyer).

- A modo de ejemplo para preparar un compuesto de fórmula (I), en la que: R¹ es (+)-CH₂-ftalimido, (+)-CH₂-succinimido o (+)-CH₂-maleimido, R² es F, Cl, Br, NO₂, di(C₁-C₆)alquilamino, (C₁-C₆)alquilamida, di(C₁-C₆)alquilamida, R³ es H, y X es H₂ se puede hacer reaccionar un precursor de fórmula (I) en la que: R¹ es (+)-CH₂-NH₂, R² es F, Cl, Br, NO₂, (C₁-C₆)alquilamino, di(C₁-C₆)alquilamino, (C₁-C₆)alquilamida, di(C₁-C₆)alquilamida, R³ es H, y X es H₂ con anhídrido ftálico, succínico o anhídrido maleico.

- A modo de ejemplo adicional, un compuesto de fórmula (I) o (II) de la invención donde X es O se puede preparar a partir de un precursor en el que X es OH por una reacción de oxidación convencional en química orgánica.

Breve descripción de las figuras.

En general, la Figura 1 muestra el efecto de los compuestos **1** y **2** sobre la infectividad de HHV-1, HHV-2 y DENV-2 en células Vero.

- Las Figuras 1A y 1B muestran los resultados de reducción del tamaño de la placa viral del compuesto **1** en presencia de una cepa de HHV-1 sensible al Aciclovir (CDC Atlanta)

Las Figuras 1C y 1D muestran los resultados de reducción del tamaño de la placa viral del compuesto **2** en presencia de una cepa de HHV-2 sensible al Aciclovir (VR-734).

Las Figuras 1E y 1F muestran resultados del compuesto **1** sobre la reducción del tamaño de placa viral frente a HHV-1 (cepa 29R) resistente al Aciclovir.

- 35 La Figura 1G y 1H muestra resultados del compuesto **1** sobre la reducción del tamaño de placa viral frente a DENV-2 (cepa Nueva Guinea).

Los resultados de las barras se expresan como un promedio del tamaño de área de la placa (en mm) de 80 placas formadas en células tratadas con los compuestos **1** y **2** respecto a los controles virales sin tratamiento. Las imágenes muestran la representación del análisis de imágenes usando el software

Image-Pro Plus 6.0, durante el tratamiento con los compuestos 1 y 2. Diferencias estadísticamente significativas se observaron en todos los experimentos $p < 0,001$ (***)). Dos experimentos independientes se llevaron a cabo por duplicado para cada compuesto y para cada virus.

Métodos

5 Reactivos y compuestos

El Medio Esencial Mínimo Modificado de Eagle Dulbecco (DMEM) y el reactivo para la técnica del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (Nueva Jersey, EE.UU.). El Suero Fetal Bovino (SFB) y el antibiótico penicilina/estreptomicina/neomicina (PSN) se adquirieron de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EE.UU.). El aciclovir se obtuvo del laboratorio Biogen. La ribavirina fue obtenida de Calbiochem (EE.UU.). El paclitaxel, doxorubicina, anfotericina B e itraconazol fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co. La terbinafina se obtuvo de Laboratorios Recalcine, Santiago de Chile. El dimetilsulfóxido (DMSO) se obtuvo de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).

15 Cultivos celulares y virus

Para el *cribado* y los ensayos de inhibición se emplearon: un aislado de herpesvirus humano tipo 1 (HHV-1) sensible a Aciclovir, donado por el grupo de Inmunovirología de la Universidad de Antioquia (cepa viral CDC Atlanta: comprada al "Center for Disease Control-Atlanta", GA, USA), una cepa de Herpesvirus humano tipo 2 (HHV-2) sensible a Aciclovir (Cepa G, ATCC: VR-734) y el virus dengue tipo 2 (DENV-2) cepa Nueva Guinea, obtenido de Eva Harris (Instituto de Ciencias Sostenibles y de la Universidad de California en Berkeley), el cual se amplificó en células C6/36HT de *Aedes albopictus* (Martínez-Gutiérrez et al., 2011). Además, para los ensayos de reducción del tamaño de la placa se incluyó una cepa de HHV-1 29R (cepa resistente a Aciclovir) donada por Claudia Oliveira (Universidad de Santa Catarina-Brasil).

Las células Vero (células de riñón de mono verde africano ATCC CCL-81) fueron mantenidas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, en fase logarítmica de crecimiento en DMEM, suplementado con 5% de SFB inactivado, 1µg/mL de penicilina/estreptomicina, 2µg/mL de neomicina, vitaminas (cloruro de colina, D-pantotenato de calcio, ácido fólico, nicotinamida, hidrocloreuro de piridoxal, riboflavina, hidrocloreuro de tiamina e i-inositol), aminoácidos no esenciales y glutamina al 1%. Estas células se emplearon para amplificar los virus, realizar los ensayos de citotoxicidad y los ensayos antivirales. Las células C6/36HT (células de *A. albopictus*), empleadas para realizar la expansión del virus dengue fueron mantenidas a 34°C en atmósfera de CO₂ al 10% de SFB, además de las condiciones anteriormente descritas.

Para la evaluación de la actividad citotóxica, se emplearon las líneas celulares de células de adenocarcinoma epitelial de cuello de útero humano (HeLa ATCC CCL2), células de leucemia T aguda (Jurkat ATCC TIB-152) y línea celular promonocítica humana (U937 ATCC CRL-1593.2), así como la línea celular Vero (no tumoral). Las células Vero y HeLa se mantuvieron en DMEM suplementado al 5% de SFB. Las células Jurkat y U937 se mantuvieron en medio RPMI-1640 (suplementado con 10% de SFB), 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de neomicina y mantenido a 37°C en atmósfera humidificada del 5% de CO₂.

35 Actividad antiviral

Cuantificación viral

Para los ensayos de cribado primario, la determinación del título viral de las cepas herpéticas y del virus dengue se llevaron a cabo las técnicas de titulación de punto final (EPTT) e inhibición del efecto citopático (ICPE), respectivamente. Para la titulación del cribado primario se prepararon siete diluciones dobles seriadas 1:10 de la suspensión viral a titular; luego, se inoculó cada una de las diluciones en la monocapa de células Vero formada en un 80% en platos de 96 pozos. Los platos se incubaron por 48h (HHV-1) y 72h (HHV-2 y DENV-2) en atmósfera de CO₂ al 5%, posteriormente se fijaron y tiñeron con una solución de 3,5% de formaldehído/cristal violeta al 0,2%. Finalmente se determinó observando bajo el microscopio invertido la dilución en la que se produjo un efecto sobre el 50% de la monocapa celular infectada, la cual corresponde a 1 Dosis Infecciosa de Cultivo Celular 50 (1DICC₅₀).

Para los ensayos de inhibición, la cuantificación de las partículas virales de HHV-1 (CDC-Atlanta y 29R), HHV-2 y DENV-2 se realizó en células Vero mediante el ensayo de unidades formadoras de placas

ES 2 586 505 A1

(PFU). En este ensayo se sembraron 250.000 células/pozo (Cepas de herpes) y 90.000 células/pozo (DENV-2) en platos de 24 pozos los cuales se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. A las 24 horas se inocularon las células con 3 réplicas de diluciones seriadas del stock viral desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁷ en DMEM sin SFB. Pasada 1h de incubación se retiró el inóculo viral y se adicionó carboximetilcelulosa (CMC) al 1, 0,75 y 2%, para HHV-1, HHV-2 y DENV-2; respectivamente. Luego de 72 horas (HHV) y 8 días (DENV) de incubación, los platos se fijaron y tiñeron con una solución de 3,5% de formaldehído/cristal violeta al 0,2%.

En todos los casos, el virus titulado para la realización de los diferentes ensayos se conservó en alícuotas a -80°C hasta su posterior uso.

10 Cribado de la actividad de derivados abietanos contra HHV-1 y HHV-2

La actividad anti-herpética se determinó mediante la Técnica de Titulación de Punto Final (EPTT). Para ello se utilizaron células Vero (2.0 x10⁴ células/pozo), cultivadas en platos de 96 pozos a 37°C (5% de CO₂) hasta la formación ≥ 80% de la monocapa celular. Posteriormente se preparó una solución viral de 100 DICC₅₀, a partir de la cual se realizan cinco diluciones seriadas 1:10. Una mezcla virus (10 DICC₅₀)/compuesto se realizó en DMEM suplementado (2% SFB) el cual contenía CMC al 1% y 0,5% para HHV-1 y HHV-2, respectivamente. Dicha mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se añadió a las células. En paralelo, se agregaron cuatro diluciones seriadas de los compuestos directamente sobre la monocapa celular, con el fin de determinar la concentración citotóxica del 100%, es decir, aquella que destruye en su totalidad la monocapa celular.

20 Luego de 48 horas (HHV-1) y 72 horas (HHV-2) de incubación, los platos se fijaron y tiñeron con una solución de 3,5% de formaldehído/cristal violeta al 0,2% y se determinó el factor de reducción del título viral comparando el efecto de los compuestos durante la infección frente al control del título viral sin tratamiento (que consistió de las cinco diluciones seriadas 1:10 a partir de la solución viral de 100 DICC₅₀). Los compuestos se evaluaron en un rango de concentración de 6,25-50 µg/mL. Los controles incluidos fueron: células no tratadas, células tratadas con los compuestos y células infectadas con HHV-1 o HHV-2. El control positivo incluido en este experimento fue el Aciclovir. Dos experimentos independientes por cuadruplicado se llevaron a cabo para cada virus y para cada compuesto. De acuerdo con los parámetros establecidos por *Vlietinck et al., J. Ethnopharm. 46: 31-47 (1995)*, la actividad antiviral relevante o moderada de un producto natural purificado, es aquella cuyo factor de reducción (*R_f*) de título viral es ≥ a 1x10³ o 1x10², respectivamente. En este estudio el mismo criterio de actividad fue tenido en cuenta.

Cribado de la actividad de derivados abietanos contra DENV-2

Para determinar la actividad anti-DENV, se determinó la Inhibición del Efecto Citopático (ICPE) de acuerdo al protocolo descrito previamente por *Tang et al., BMC Complementary and Alternative Medicine. 12, 1-10 (2012)* con algunas modificaciones. Células Vero (2.0x10⁴ células/pozo) se cultivaron en platos de 96 pozos a 37°C (5% de CO₂) hasta la formación ≥ 80% de la monocapa celular. Después de 24 horas se retiró el medio de las células y 50 µL de cada dilución (compuesto/DENV-2) fueron añadidos; en dicha mezcla, se pusieron en contacto cuatro diluciones seriadas dobles del virus DENV-2 con una concentración constante no citotóxica previamente definida del compuesto a evaluar. Los platos se incubaron a 37°C durante tres días, posteriormente se fijaron y tiñeron con una solución de formaldehído al 3,5%/cristal violeta al 0.2% y la ICPE se observó bajo microscopio invertido. Los compuestos se evaluaron a una concentración entre 6,25 µg/mL y 25 µg/mL, considerándose activos aquellos compuestos que ejercieron un efecto protector sobre la monocapa celular en presencia de la infección. Los controles incluidos fueron: células no tratadas, células tratadas con los compuestos y células infectadas con DENV-2. El control positivo incluido en este experimento fue la ribavirina. Dos experimentos independientes por cuadruplicado se llevaron a cabo para este ensayo.

Ensayos para las etapas pre- y post-infectivas de HHV-1, HHV-2 y DENV-2.

Posteriormente, el potencial antiviral de los compuestos se evaluó mediante el ensayo de Inhibición de Unidades Formadoras de Placas (PFU) como se ha descrito previamente por *Cardozo et al, Antiviral Research. 1-7 (2011)*. Para la evaluación de las etapas pre-infectivas, una mezcla de 100 PFU/pozo de virus y compuesto se agregó a la monocapa de células Vero (2.5 x10⁴ células/pozo) previamente sembrada en platos de 24 pozos y se incubó durante 1 hora a 37°C (5% de CO₂). Después de la incubación se realizó un lavado con PBS (pH=7.0) y se agregó CMC al 1% ,0.75% y 2% para HHV-1,

HHV-2 y DENV-2, respectivamente. Para los ensayos post-infección, 100 PFU/pozo de virus se agregaron a la monocapa celular y se incubaron durante 1 hora a 37°C (5% de CO₂). Luego se realizó un lavado con PBS (pH=7.0) y se agregaron los compuestos previamente preparados en CMC al 1%, 0.75% y 2% para HHV-1, HHV-2 y DENV-2, respectivamente. Tanto para el ensayo pre y post-infección, los platos se dejaron incubar durante 72 horas (herpesvirus) y 8 días (DENV-2) se fijaron, se tiñeron y se realizó el conteo de placas con el fin de determinar la concentración que inhibe en un 50 % el número de placas (EC₅₀).

Los análogos del ferruginol 1 y 2 se evaluaron en un rango de concentración de 0,78 µg/mL-6,25 µg/mL y 1,56 µg/mL-12,5µg/mL, respectivamente para los ensayos con herpes, y en un rango de concentración de 0.05-1.56 µg/mL para los ensayos con dengue. El Dextran sulfato (DEX-S) se utilizó como control positivo en etapas pre-infectivas. Aciclovir (ACV) y Ribavirina (RIBA) se usaron como control positivo en las etapas post-infectivas de las cepas de HHV y DENV-2, respectivamente. Los valores de EC₅₀ para cada compuesto fueron obtenidos por análisis de regresión lineal de curvas de dosis-respuesta, empleando el programa estadístico GraphPad Prisma 5.0 y fue expresada como la media ± la desviación estándar de tres ensayos independientes por duplicado. Para definir qué compuestos fueron más selectivos contra las células infectadas que hacia las células no infectadas, se calculó el índice de selectividad antiviral (SI), definido como la relación entre la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) en células Vero y la EC₅₀ para cada virus en células Vero.

Ensayo de reducción del tamaño de placa viral

Adicionalmente al efecto dependiente de la dosis presentado por los compuestos 1 y 2 en etapas post-infectivas se observó una reducción del tamaño de la placa viral. Para confirmar este efecto se realizó un ensayo de PFU donde se añadieron los compuestos sobre las células Vero (2.5 x10⁴ células/pozo) 2h después de la infección con 100 PFU/pozo de los virus (Ekblad et al., 2006). Los compuestos preparados previamente en CMC se añadieron a concentraciones desde 1,56 µg/mL hasta 12,5 µg/mL para el compuesto 1 y de 0,78 µg/mL hasta 6,25 µg/mL en el caso del compuesto 2, tanto para HHV-1 (CDC-Atlanta y 29R) como para HHV-2. Para determinar el efecto contra DENV-2 los compuestos se añadieron en un intervalo de concentración de 0,05 a 1,56 µg/mL. Finalmente, los platos se incubaron durante 72 horas (cepas de HHV) y 8 días (DENV-2) se fijaron y tiñeron con una solución de 3,5% de formaldehído/0,2% de cristal violeta. Las imágenes de 20 placas por cada concentración del compuesto y cada pozo de las respectivas réplicas, se capturaron usando una cámara Nikon digital vista DS-L1 unida a un microscopio invertido Nikon. El área en milímetros de cada placa se determinó utilizando el software Image-Pro Plus 6.0 ®. Dos ensayos independientes se realizaron por duplicado.

Actividad citotóxica:

La inhibición del crecimiento celular y/o citotoxicidad se evaluó en células Vero, HeLa, Jurkat U937, usando la técnica del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolio) (Sigma, New Jersey, USA) según el protocolo descrito por Zapata et al. (Zapata et al., 2013) con algunas modificaciones. Células Vero y HeLa (2,0 x 10⁴ células/pozo) se sembraron en platos de 96 pozos y se incubaron 24 h a 37°C. Las células Jurkat y U937 (3,0 x 10⁴ células/pozo), se cultivaron en platos de 96 pozos fondo redondo. Después las diluciones de los compuestos se agregaron y las placas se incubaron otras 48 h adicionales a 37 °C (5% CO₂). Finalmente, se agregó el reactivo del MTT y se realizó la lectura en espectrofotométrica 570 nm para determinar la concentración de los compuestos que inhibe el 50% del crecimiento (IC₅₀). Los valores de IC₅₀, para cada compuesto fueron obtenidos por análisis de regresión lineal de curvas de dosis-respuesta a partir de las absorbancias obtenidas utilizando el programa estadístico GraphPad Prisma 5.0 y fueron expresados como la Media ± la Desviación Estándar de dos ensayos independientes por cuadruplicado (M ± SD). Para definir qué compuestos fueron más selectivos frente las líneas celulares de tipo tumoral que hacia las células no tumorales se calculó el índice de selectividad (IS) definido como la IC₅₀ en células Vero sobre la IC₅₀ en HeLa, Jurkat o U937. Un compuesto con IS ≥ 5 se consideró selectivo. Paclitaxel y Doxorubicina se usaron como controles positivos.

50

Actividad antifúngica

La actividad antifúngica *in vitro* de los compuestos se evaluó siguiendo el protocolo M38-A del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2008) para hongos filamentosos con ligeras modificaciones y el método estándar propuesto por el *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee* del *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (AFST-EUCAST) para levaduras (Cuenca-Estrella et al., 2003). Los hongos filamentosos *Fusarium oxysporum* (ATCC 48112), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305), *Aspergillus flavus* (ATCC 204304), *Aspergillus terreus* (CDC 317) y los dermatofitos, *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 24198) se emplearon para evaluar la actividad antifúngica frente a un inóculo de $0,2-2,5 \times 10^5$ UFC/mL. Las levaduras *Candida albicans* (ATCC 1023) *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) y *Candida tropicalis* (ATCC 200956) se usaron para evaluar la actividad antifúngica frente a un inóculo de $1-5 \times 10^5$ CFU/mL. Diferentes diluciones de los compuestos se agregaron en platos de 96 pozos fondo plano por duplicado a concentraciones finales entre 3,125 y 50 µg/mL. Los compuestos fueron considerados activos si muestran valores de concentración inhibitoria mínima (CMI \leq 50 µg/mL) MIC. Para el método CLSI M38-A, la CMI se definió como la dilución más baja que resultó en un 80% de inhibición del crecimiento visible del hongo después de 48 horas de incubación a 28°C para *F. oxysporum* y seis días para los dermatofitos. Como controles positivos, la anfotericina B se evaluó contra las cepas de *A. fumigatus* (ATCC 204305) y *A. flavus* (ATCC 204304), y la terbinafina frente a los dos dermatofitos. Para el método de AFST-EUCAST, la CMI se determinó después de 24 h de incubación a 35°C y se define como la concentración más baja que mostro reducción del 90% del crecimiento. El itraconazol se utilizó como control positivo a para este ensayo. En todos los experimentos se incluyó un control negativo (inóculo sin tratamiento). Los valores de CMI se expresaron como la media geométrica (MG-CMI) de los ensayos realizados por duplicado en tres días distintos frente a cada especie de hongos.

Resultados25 Actividad biológica

Los compuestos sintetizados **1** y **2** se evaluaron para la actividad antiviral. Los resultados del cribado se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Reducción de título viral, inhibición del efecto citopático y actividad antiviral contra HHV-1, HHV-2 y DENV-2 de los derivados abietanos **1** y **2**.

Línea celular Vero ^a						
Compuesto	HHV-1		HHV-2		DENV-2	
	Rf ^b	Actividad antiviral (µg/mL) ^c	Rf ^b	Actividad antiviral (µg/mL) ^c	Inhibición del CPE ^d	Actividad antiviral (µg/mL) ^c
1	10 ²	6.25	10 ³	12.5	+	12.5
2	NA	NA	10 ³	12.5	+	12.5
Aciclovir	10 ⁴	1.5	10 ³	1.5	NE	NE
RIBA	NE	NE	NE	NE	+	30

30

^a Línea celular de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) ATCC CCL- 81.

^b Factor de reducción del título viral

^c Máxima concentración no citotóxica que muestra reducción del título viral o inhibición del efecto citopático.

35

^d Inhibición del efecto citopático (+). **ACV**: Aciclovir; **RIBA**: Ribavirina; **NA**: No activo; **NE**: No evaluado; **HHV-1** (cepa CDC-Atlanta); **HHV-2** (cepa VR-734); **DENV-2** (cepa Nueva Guinea).

40

Los resultados muestran que el compuesto **1** presenta actividad moderada frente HHV-1 (Rf=1x10²) a una concentración de 6,25 µg/mL; actividad relevante frente HHV-2 (Rf=1x10³) y un efecto protector sobre la monocapa celular infectada con DENV-2 a una concentración de 12,5 µg/mL. Durante la infección con DENV-2, el efecto protector durante el tratamiento con la molécula **1** fue comparable con la integridad celular observada en el control de células no infectadas. Por su parte, el compuesto **2** presentó actividad relevante contra HHV-2 (Rf=1x10³) a una concentración de 12,5 µg/mL y un efecto protector notable sobre la monocapa celular infectada con DENV-2, aunque menor que el ejercido por el compuesto **1** en la misma concentración ensayada (12,5 µg/mL). Sin embargo, el compuesto **2** no mostró ser activo para HHV-1. Es de notar que la concentración a la cual los análogos del ferruginol ejercen actividad anti-dengue, es menor e igual de efectiva a la del control positivo empleado para este ensayo (ribavirina).

45

Por tanto, la actividad antiviral del compuesto **1** contra HHV-1, HHV-2 y DENV-2 sugiere un posible efecto antiviral de amplio espectro contra virus envueltos con genoma de DNA y RNA, tales como herpes y dengue.

Actividad antiviral de los compuestos 1 y 2 en etapas pre y post-infectivas.

5 La **Tabla 2** muestra que los compuestos **1** y **2** fueron eficaces en etapas post-infectivas.

Tabla 2. Actividad antiviral de los compuestos **1** y **2** en etapas pre y post-infección.

Compuesto	IC ₅₀ µg/mL 72h	IC ₅₀ µg/mL 8 días	EC ₅₀ (µg/mL) (IS)			EC ₅₀ (µg/mL) (IS)		
			Tratamiento Pre-infeccion			Tratamiento Post-infeccion		
			HHV-1	HHV-2	DENV-2	HHV-1	HHV-2	DENV-2
1	82,3	34,9	NA	NA	NA	NA *	8,3 (10)	0,6 (58,1) *
2	29,4	15.7	NA	NA	NA	5,9 (4,9)	5,0 (5,9) *	1,5 (10,4)
DEX-S	>400	NE	0,6	0,5	NE	NE	NE	NE
ACV	>400	NE	NE	NE	NE	0,5	0,06	NE
RIBA	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	3.3

10 **EC₅₀**: Concentración antiviral efectiva del 50%; **IC₅₀**: Concentración del compuesto que induce 50% de inhibición del crecimiento celular a las 72 horas y 8 días; **DS**: desviación estándar; **DEX-S**: Dextrán sulfato; **ACV**: Aciclovir; **RIBA**: Ribavirina. En paréntesis: valores de índice de selectividad antiviral (**IS** = IC₅₀/EC₅₀), *Reducción del tamaño de las placas virales. **NA**: No activo; **NE**: No evaluado. Los valores representan la media de tres experimentos independientes; **HHV-1** (cepa CDC-Atlanta); **HHV-2** (cepa VR-734); **DENV-2** (cepa Nueva Guinea).

15 En ambos tratamientos, se llevó a cabo un ensayo de reducción de placa y la concentración de los compuestos **1** y **2** que redujo el número de placas virales en un 50% (EC₅₀) fue interpolada a partir de curvas de dosis-respuesta. Además los valores del índice de selectividad (IS) antiviral se calcularon mediante la relación entre la concentración inhibidora 50 (IC₅₀) en células Vero y EC₅₀ de cada virus (IC₅₀/EC₅₀) (Tabla 2).

20 El compuesto **1** reduce el 50% de las unidades formadoras de placa a una concentración de 8,3 µg/mL contra HHV-2 y mostró un índice de selectividad antiviral mayor (SI=10), mientras que el compuesto **2** redujo el número de placas en un 50% a concentraciones de 5,9 µg/mL y 5,0 µg/mL, para HHV-1 y HHV-2, respectivamente. Los controles usados DEX-S y ACV, mostraron actividad antiviral en pre y post-tratamiento, respectivamente.

25 Se evaluó también la actividad anti-dengue para los análogos de ferruginol a los 8 días post-infección (d.p.i), siendo los compuestos **1** y **2** activos a una EC₅₀ de 0,6 µg/mL (IS=58,1) y 1,5 µg/mL, (IS = 10,4), respectivamente.

30 El índice de selectividad anti-viral se define como la efectividad de un producto para inhibir la replicación viral comparado con la capacidad de inducir la muerte celular. Además, es útil para hacer comparaciones de bioactividad y diseñar compuestos más potentes. Recientemente se ha descrito que valores mayores de 10 (SI>10) se consideran indicativos de un agente terapéutico potencial que debería ser sometido a estudios biofarmacéuticos y pre-clínicos (Chattopadhyay et al., 2009; FDA-CDER, 2006).

35 Estudios previos han mostrado que derivados dehidroabietanos muestran una actividad moderada contra HHV-1 Y HHV-2 con valores por debajo de 100 µg/mL (González et al. 2010; Agudelo-Gómez et al., 2012). Los resultados de esta invención, sin embargo, muestran una actividad antiviral relevante a concentraciones más bajas (entre 6,25 µg/mL y 12,5 µg/mL).

Además del efecto dependiente de la dosis previamente descrito durante el tratamiento post-infección, se observó que los compuestos **1** y **2** inducen una reducción en el tamaño de la placa viral. Para determinar el promedio de reducción del tamaño de la placa durante el tratamiento con los compuestos en relación con el control viral sin tratamiento, se realizó el ensayo de PFU y posteriormente un análisis de imágenes utilizando el software Image-Pro Plus 6.0 (**Figura 1**). El área de las placas se midió en milímetros y diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) se observaron en todos los casos. Los porcentajes de reducción reportados a continuación para cada virus, hacen referencia a la reducción del tamaño de la placa viral durante el tratamiento con los compuestos, comparado con el control viral sin tratamiento (100%).

El análisis de imagen muestra que el compuesto **1** reduce dramáticamente el tamaño de la placa viral de HHV-1 (CDC-Atlanta) equivalente a un 93,7%, a una concentración de 12,5 µg/mL (**Figura 1A**). En cuanto a HHV-2, el compuesto **2** redujo en un 68,2% el tamaño de las placas virales respecto al control viral sin tratamiento, a una concentración de 6,25 µg/mL (**Figura 1C**). Durante el tratamiento con el compuesto **1** en células infectadas con HHV-1 (cepa 29R-resistente a aciclovir, con una mutación en la timidina quinasa) se observó un efecto similar al encontrado para la cepa de HHV-1 (CDC-Atlanta-sensible a aciclovir), ya que esta molécula reduce el tamaño de la placa viral en un 87,1%, a una concentración de 12,5 µg/mL (**Figura 1E**). Esto sugiere que no se requiere la fosforilación por la timidina quinasa viral para que este compuesto ejerza su acción, por lo que es posible que la actividad anti-herpética de este compuesto difiera de la de otros análogos de nucleósidos. Así mismo, se observó reducción del 77,9% en el tamaño de la placa viral cuando células infectadas con DENV-2 fueron tratadas con el compuesto **1** a una concentración de 1,56 µg/mL (**Figura 1G**).

La representación morfológica de las placas de HHV-1 (cepas CDC-Atlanta y 29R) y DENV-2 después del tratamiento con el compuesto **1** y el control sin tratamiento se muestra en las **figuras 1B, 1F y 1H**, respectivamente. La **figura 1D** representa el tamaño de la placa posterior al tratamiento con el compuesto **2** durante la infección con HHV-2, al igual que el control viral sin tratamiento. En cada caso se nota de manera evidente la drástica reducción del tamaño de la placa durante el tratamiento con los compuestos, respecto al control de la infección.

La reducción en el tamaño de la placa de HHV-1 y HHV-2 desarrollado en presencia de los compuestos **1** y **2** sugiere que estos derivados abietanos pueden impedir replicación viral, la liberación de HHV, y/o dispersión célula a célula.

Es de destacar como ventaja de los compuestos de la invención, que el uso de la ribavirina como control positivo frente a la infección por DENV-2 ha permitido demostrar que el compuesto **1** es cinco veces más potente que aquella, mientras que el compuesto **2** es dos veces más potente que la ribavirina, teniendo por lo tanto que usar la mitad de la dosis que en el caso del uso de ribavirina para conseguir el mismo efecto.

En la **Tabla 3** se muestra la actividad citotóxica sobre las células Vero, así como sobre células tumorales HeLa, Jurkat and U937 del ferruginol y de los compuestos 1 y 2.

Tabla 3. Citotoxicidad (IC₅₀-µg/mL) del ferruginol y compuestos 1 y 2 sobre líneas celulares HeLa, Jurkat, U937 y Vero.

Compuestos	Líneas celulares						
	HeLa		Jurkat		U937		Vero
	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)	IS	IC ₅₀ (µg/mL)
Ferruginol	18,6	1.4	13,8	1,9	6,1	4,2	25,9
1	>25	NA	>25	NA	>25	NA	NE
2	18,0	1,5	6,5	4.2	10,0	2.7	27,3
PXT	0,085	NA	0,0004	NA	0,005	NA	0,55
DOX	0,484	NA	0,007	NA	0,045	NA	1,12

NA: no aplicable; NE: no evaluado.

IC₅₀: Concentración del compuesto que induce 50% de inhibición del crecimiento celular a las 48 horas. **IS**: índice de selectividad definido como la IC₅₀ en células Vero respecto a la IC₅₀ en Jurkat, U937 o a HeLa. **Jurkat**: Línea celular de leucemia de células T aguda humana ATCC TIB-152; **U937**: Línea celular promonocítica humana ATCC CRL-1593.2; **HeLa**: Células de adenocarcinoma epitelial de cuello uterino humano ATCC CRL-1958; **PXT**: Paclitaxel; **DOX**: Doxorubicina. Los valores representan la media de dos ensayos independientes por cuadruplicado.

El ferruginol produjo una inhibición dependiente de la dosis sobre el crecimiento de las líneas celulares tumorales Jurkat, U937 y HeLa y la línea celular Vero, con un R² (coeficiente de regresión lineal) > 0,8. El compuesto **2** y el ferruginol, mostraron actividad citotóxica contra al menos una línea celular tumoral a concentraciones por debajo de 25 µg/mL. El compuesto **1** no fue activo contra ninguna línea celular tumoral y la línea celular Vero.

Adicionalmente, se determinó la actividad antifúngica de los compuestos contra dos dermatofitos (*T. rubrum* y *T. mentagrophytes*) y los hongos filamentosos *F. oxysporum*, *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. terreus*. En la **Tabla 4** se muestra la actividad antimicótica de los análogos del ferruginol 1 y 2 contra levaduras y hongos filamentosos.

Tabla 4. Actividad antimicótica de los derivados del ferruginol 1 y 2 contra levaduras y hongos filamentosos.

Compuesto	MG-CMI (µg/mL)								
	Fo7	Tr1	Tm1	Afu8	Afl6	INM7	Ca4	Cp2	INM13
1	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
2	>50	12,5	25	>50	>50	>50	>50	>50	>50
TERB		<0.0078	<0.0078	-	-	-	-	-	-
AMB		-	-	0.5	0.25	-	-	-	-
ITZ		-	-	-	-	-	-	0.25	-

MG-CMI: Media Geométrica-Concentración Mínima Inhibitoria. **Fo7**: *Fusarium oxysporum* ATCC 48112; **Tr1**: *Trichophyton rubrum* ATCC 28188; **Tm1**: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 24198; **Afu8**: *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305; **Afl6**: *Aspergillus flavus* ATCC 204304; **INM7**: *Aspergillus terreus* CDC 317; **Ca4**: *Candida albicans* ATCC 10231; **Cp2**: *Candida parapsilosis* ATCC 22019; **INM13**: *Candida tropicalis* ATCC 200956. **TERB**: Terbinafina; **AMB**: Anfotericina B; **ITZ**: Itraconazol. Los valores representan la media geométrica de tres experimentos independientes por duplicado.

El compuesto **2** mostró actividad anti-dermatofitos contra *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* con valores GM-MIC de 12,5 y 25 µg/mL, respectivamente. El compuesto **1** no presentó actividad frente a las cepas evaluadas.

Como conclusión, los resultados obtenidos en la presente invención revelan que a diferencia de la molécula **2** que presentó actividad anti-dermatofitos y citotóxica sobre células de tipo tumoral, el compuesto **1** podría ser una molécula selectiva contra virus envueltos como herpes y dengue, debido a que no presentó efecto citotóxico sobre las líneas celulares de tipo tumoral HeLa, Jurkat y U937 y no mostró actividad antifúngica ante ninguna de las cepas micóticas evaluadas.

Bibliografía.

- Martínez-Gutiérrez M., Castellanos J., Gallego-Gómez J.C. Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly. *Intervirology*. 2011;54(4):202-216.
- Stranska R, Schuurman R, Nienhuis E, Goedegebuure IW, Polman M, Weel JF, Wertheim-Van Dillen PM, Berkhout RJ, Van Loon AM. Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization. *J. Clin. Virol*. 2005, 32:7-18.
- Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, et al. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin. Microbiol. Rev*. 2003, 16: 114–128.
- Nagot N, Ouédraogo A, Foulongne V, et al. Reduction of HIV-1 RNA levels with therapy to suppress herpes simplex virus. *N. Engl. J. Med*. 2007;356: 790-9.

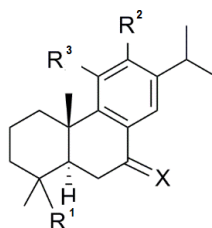
- Schacker T, Zeh J, Hu H, Shaughnessy M, Corey L. Changes in plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA associated with herpes simplex virus reactivation and suppression. *J. Infect. Dis.* 2002; 186:1718-25.
- 5 Bermejo A, Uranga AI, D'Atri G, Deane L, Olivares L, Pizzariello G, Forero O, Coringrato M, Maronna E. Herpes simplex en paciente inmunocomprometidos por VIH y terapia esteroidea en dermatosis ampollares. *Dermatol. Argent.* 2011; 17(1):52-56.
- 10 AISMED. Virus Herpes Simple (herpes oral y genital). http://www.aidsmeds.com/articles/herpes_6787.shtml (consultado: 20-12-2013).
- Li F, Maag H, Alfredson T. Prodrugs of nucleoside analogues for improved oral absorption and tissue targeting. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97(3):1109-34.
- 15 Mansfield Dales JR. Novartis International Pharmaceutical Ltd. "Multistep synthesis of penciclovir or famciclovir starting with 2-amino-6-chloropurine". U.S. Patent 6,846,927, Ene 25, 2005
- Taylor, M.P., Koyuncu, O.O., Enquist, L.W., 2011. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nature Reviews Microbiology.* 9, 427-439 (2011).
- 20 Dixit, R., Tiwari, V., Shukla, Deepak., 2008. Herpes simplex virus type 1 induces filopodia in differentiated P19 neural cells to facilitate viral spread. *Neuroscience Letters* 440, 113–118.
- 25 Wang, J.L., Zhang, J.L., Chen, W., Xu, X.F., Gao, N., Fan, D.Y., An, J., 2010. Roles of Small GTPase Rac1 in the Regulation of Actin Cytoskeleton during Dengue Virus Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 4, 1-11.
- 30 Lin, L.T., Chen, T.Y., Chung, C.Y., Noyce, R.S., Grindley T. B., McCormick, C., Lin, T.C., Wang, G.H., Lin, C.C., Richardson, C.D., 2011. Hydrolyzable Tannins (Chebulagic Acid and Punicalagin) Target Viral Glycoprotein-Glycosaminoglycan Interactions To Inhibit Herpes Simplex Virus 1 Entry and Cell-to-Cell Spread. *Journal of virology.* 4386–4398.
- 35 Ekblad, M., Bergström, T., Banwell, M.G., Bonnet, M., Renner, J., Ferro, V., Trybala, E., 2006. Anti-herpes simplex virus activities of two novel disulphated cyclitols. *Antivir. Chem. Chemother.* 17, 97–106.
- Takei M, Umeyama A, Arihara S. Epicubenol and Ferruginol induce DC from human monocytes and differentiate IL-10-producing regulatory T cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;337(2):730-8.
- 40 Kuźma Ł, Derda M, Hadaś E, Wysokińska H. Abietane diterpenoids from *Salvia sclarea* transformed roots as growth inhibitors of pathogenic *Acanthamoeba* spp. *Parasitol. Res.* 2015;114(1):323-7. doi: 10.1007/s00436-014-4211-3. Epub 2014 Nov 11.
- 45 González MA, Clark J, Connelly M, Rivas F. Antimalarial activity of abietane ferruginol analogues possessing a phthalimide group. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014;24(22):5234-7. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.09.061.
- González, M. A. and Pérez-Guaita, D., 2012. Short syntheses of (+)-ferruginol from (+)-dehydroabietylamine. *Tetrahedron.* 68, 9612-9615.
- 50 Malkowsky, I.M., Nieger, M., Kataeva, O., Waldvogel, S. R. Synthesis and properties of optically pure phenols derived from (+)-dehydroabietylamine. *Synthesis* 2007, No. 5, pp. 0773-0778.
- 55 Chih-Chun W, Yueh-Hsiung K, Jia-Tsong J, Po-Huang, Sheng-Yang W, Hong-Gi L, Ching-Kuo L, Shang-Tzen C, et al. Specific Plant Terpenoids and Lignoids Possess Potent Antiviral Activities against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Med. Chem.* 2007, 50: 4087-4095.
- Vlietinck A.J., Van Hoof L., Totté J., Lasure A., Vanden Berghe D., Rwangabo P.C., et al., 1995. Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. *J. Ethnopharm.* 46, 31-47.
- 60 Tang, L., Ling, A., Koh, R., Chye S., and Voon K., 2012. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 12, 1-10.
- 65 Cardozo, F.T., Camellini C. M., Mascarello, A., Rossi, M.J., Nunes, R.J., Monte Barardi, C.R., Mendonça, M., Oliveira Simões, C.M., Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. *Antiviral Research.* 2011: 1-7.

- Zapata, B., Rojas, M., Betancur-Galvis, L., Mesa-Arango, A.C., Pérez-Guaita, D., González, M.A., 2013. Cytotoxic, immunomodulatory, antimycotic, and antiviral activities of semisynthetic 14-hydroxyabietane derivatives and triptoquinone C-4 epimers. *Med. Chem. Commun.* 4, 1239-1246.
- 5 Cuenca-Estrella, C.B., Moore, F., Barchiesi, J., Bille, E., Chryssanthou, D.W., Denning D.W. et al., 2003. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST), *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 467–474.
- 10 CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard-Second Edition. CLSI document M38-A2, 28 (16). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA: 2008.
- 15 Chattopadhyay D, Chawla- Sarkar M, Chatterjee T, Sharma Dey R, Bag P, Chakraborti S, Hassan Khan MT. Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. *New Biotechnology* 2009 25, 5: 347-368.
- 20 (FDA- CDER) Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry, Antiviral Product Development-Conducting and Submitting Virology Studies to the Agency. U.S. Department of Health and Human Services. 2006.
- 25 González, M.A., Pérez-Guaita, D., Correa-Royero, J., Zapata. B., Agudelo, L., Mesa-Arango, A., Betancur-Galvis, L., 2010. Synthesis and biological evaluation of dehydroabietic acid derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 45,811-816.
- Agudelo-Gómez, L. S., Betancur-Galvis, L. A., González, M.A., 2012. Anti HHV-1 and HHV-2 activity in vitro of abietic and dehydroabietic acid derivatives. *PharmacologyOnline.* 1, 36- 42.

30

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de ferruginol de fórmula (I)



5

(I)

en la que R^1 , R^2 , R^3 y X tienen independientemente el significado siguiente:

- R^1 es CH_2 -ftalimido, CH_2 -succinimido, CH_2 -maleimido, CH_2 - NHCOCH_3 , CH_2 - NHCOCF_3 , CHO, CH_2OH , $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ carboxiester, o CH_3 y donde R^1 tiene cualquier estereoquímica,
- R^2 es H, OH, F, Cl, Br, NO_2 , NH_2 , $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ alquilamino, $\text{di}(\text{C}_1\text{-C}_6)$ alquilamino, $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ alquilamida o $\text{di}(\text{C}_1\text{-C}_6)$ alquilamida,
- R^3 es H o OH,
- X es H_2 , O, OH o NOH, donde X puede tener cualquier estereoquímica en el caso apropiado, como cuando es OH,

15

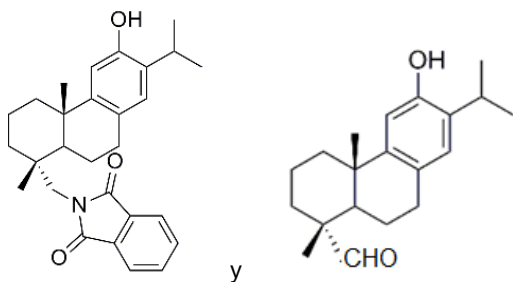
incluyendo cualquier estereoisómero, y con la condición de que no se cumplen las condiciones que den lugar a los compuestos siguientes:

- compuesto de fórmula (I) en la que R^1 es CH_2OH , R^2 es OH, R^3 es OH y X es H_2 ,
- compuesto de fórmula (I) en la que R^1 es CH_3 , R^2 es OH, R^3 es H y X es O,
- compuesto de fórmula (I) en la que R^1 es CH_3 , R^2 es OH, R^3 es OH y X es H_2
- compuesto de fórmula (I) en la que R^1 es CH_3 , R^2 es OH, R^3 es OH y X es O,

20

para su uso como antiviral.

2. Un análogo de ferruginol de fórmula (I), según la reivindicación 1, que tiene una fórmula seleccionada entre



compuesto 1

compuesto 2

25

3. Un análogo de ferruginol de fórmula (I) según la reivindicación 1 ó 2, para su uso como antiviral contra virus envueltos.

4. Un análogo de ferruginol de fórmula (I), según la reivindicación 3, para su uso como antiviral contra virus de la familia *Herpesviridae* o *Flaviviridae*.

30

5. Un análogo de ferruginol de fórmula (I), según la reivindicación 4, para su uso como antiviral contra virus seleccionados entre virus de herpes y virus del dengue.

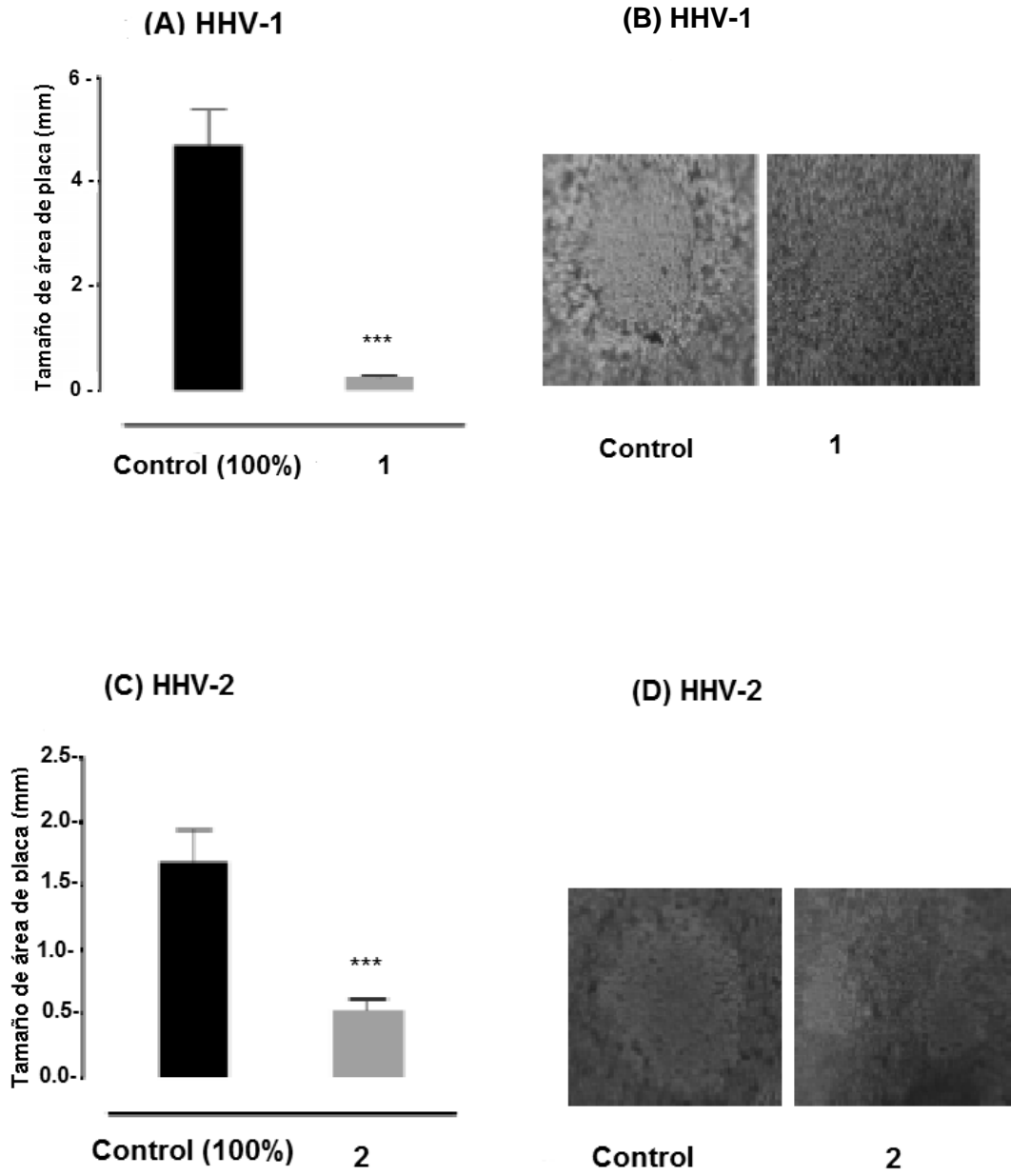


FIG. 1

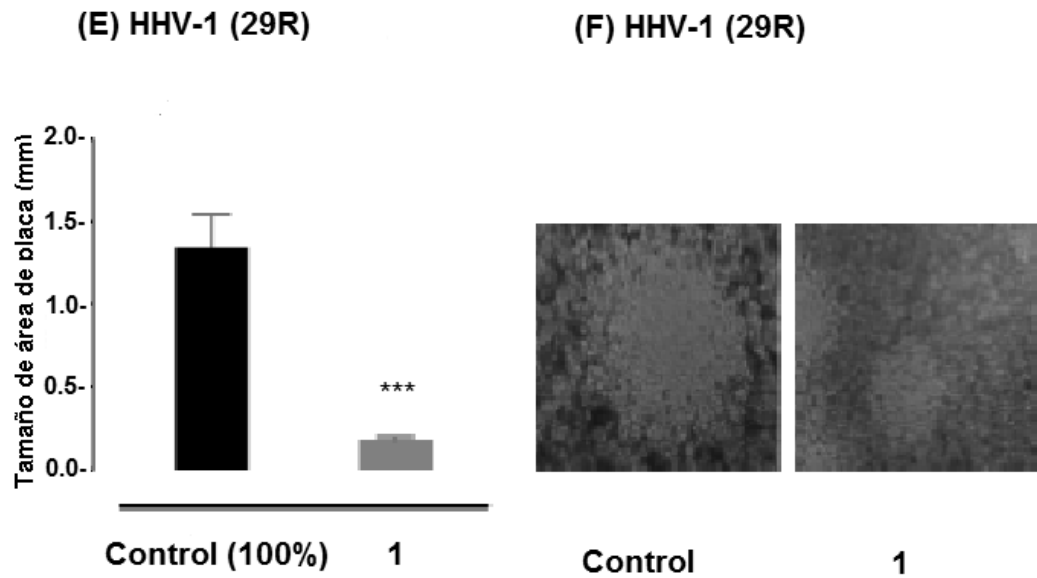


FIG. 1

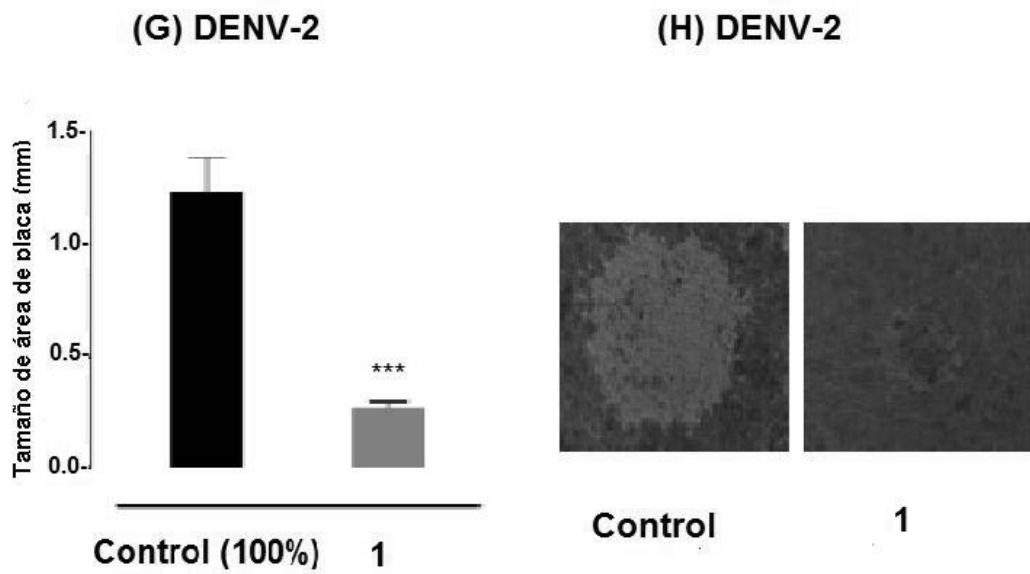


FIG. 1