

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 015**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/575** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2012 PCT/IB2012/057325**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13088400**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2012 E 12819024 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2790707**

54 Título: **Compuestos brasinoesteroides antiangiogénicos**

30 Prioridad:

**15.12.2011 AU 2011905241**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.09.2017**

73 Titular/es:

**CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET) (50.0%)  
Rivadavia 2358 4° piso  
C1034ACP Buenos Aires, 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**

ES 2 634 015 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**

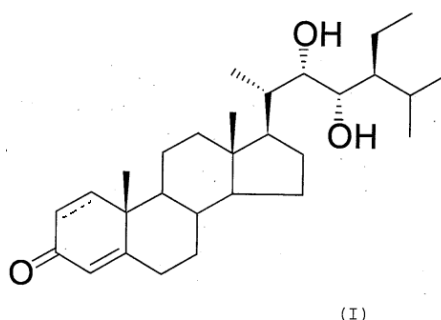
Compuestos brasinoesteroides antiangiogénicos.

**5 Campo de la invención**


La presente invención se refiere a la inhibición o la prevención de la angiogénesis como unos medios para controlar o tratar una afección angiogénica dependiente, una afección caracterizada por, o dependiente de, la proliferación de vasos sanguíneos.

10

La presente invención describe brasinoesteroides de la fórmula general (I)



15

en los que  pueden ser un enlace sencillo o doble y las configuraciones de los átomos de carbono C22 y C23, unidos respectivamente a los sustituyentes HO son S para ambos átomos de carbono, para inhibir la angiogénesis en un mamífero que presenta un tumor sólido seleccionado de entre el grupo que consiste en un carcinoma de mama, un carcinoma de pulmón, un carcinoma de próstata, un carcinoma de colon, un carcinoma de ovario, un neuroblastoma, un tumor del sistema nervioso central, un glioblastoma multiforme y un melanoma.

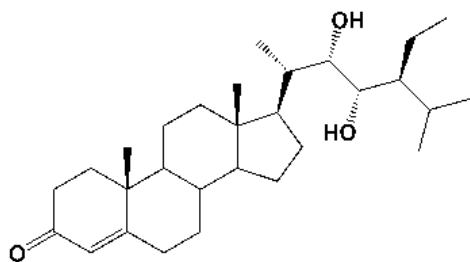
20

Una forma de realización de presente invención describe una composición que comprende brasinoesteroides de la fórmula general (I) para su utilización en el tratamiento de un tumor sólido por medio de la inhibición de la angiogénesis en un mamífero que presenta un tumor sólido seleccionado de entre el grupo que consiste en un carcinoma de mama, un carcinoma de pulmón, un carcinoma de próstata, un carcinoma de colon, un carcinoma de ovario, un neuroblastoma, un tumor del sistema nervioso central, un glioblastoma multiforme y un melanoma por medio de la administración de.

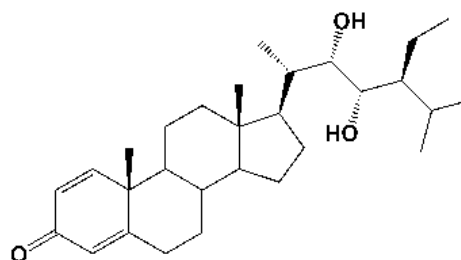
25

30

Los compuestos de la fórmula general (I) se seleccionan de (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona (Compuesto 1) y (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmasta-1,4-dien-3-ona (Compuesto 2), que presentan la siguiente fórmula estructural:



Compuesto 1



Compuesto 2

35

**Antecedentes de la invención**

La angiogénesis se considera como el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de microvasos existentes. Este proceso de generación de nuevos vasos sanguíneos ejerce un papel importante en el desarrollo de la metástasis. En condiciones fisiológicas normales, los seres humanos o los animales sufren angiogénesis en situaciones específicas y restringidas, como ejemplo, en la cicatrización de heridas, en el desarrollo fetal y embrionario y en la formación del cuerpo lúteo, el endometrio y la placenta. El control de la angiogénesis es un sistema altamente regulado que involucra estimuladores e inhibidores angiogénicos. Se ha descubierto que el control de la angiogénesis es alterado en ciertos estados de enfermedad y, en muchos casos, el daño patológico

40

asociado con la enfermedad está relacionado con la angiogénesis incontrolada.

En la angiogénesis tumoral, por ejemplo, se forman brotes capilares, su formación está inducida por un grupo de células tumorales. Sin embargo, en comparación con los vasos sanguíneos producidos en microambientes angiogénicos normales, los microvasos tumorales son morfológicamente y funcionalmente únicos. Sus redes vasculares muestran de manera típica una arquitectura desorganizada o aberrante, los tamaños lumbinales varían y el flujo de sangre puede fluctuar de manera caótica. Existen dos tipos principales de angiogénesis tumorales en términos de los eventos que siguen a la implantación de las plántulas metastásicas en las superficies y en los órganos. La primera o primaria angiogénesis es la vascularización inicial de la masa de las células tumorales que se multiplican y es considerada como un requisito previo esencial para la supervivencia y el crecimiento adicional de un depósito metastásico. La segunda es una angiogénesis continua o secundaria y es el fenómeno que se produce en ondas en la periferia de una masa tumoral en crecimiento. Esta segunda angiogénesis es esencial para la adición de los nuevos territorios de la microcirculación en el servicio del tumor en expansión y en infiltración.

La angiogénesis es un proceso altamente complejo para desarrollar nuevos vasos sanguíneos que implica la proliferación y la migración de, y la infiltración tisular por las células endoteliales capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes, del conjunto celular en estructuras tubulares, la unión de conjuntos tubulares de formación reciente en sistemas vasculares de circuito cerrado, y la maduración de los vasos capilares formados de manera reciente. Las bases moleculares de muchos de estos aspectos todavía no se entienden.

La angiogénesis es importante en procesos fisiológicos normales, que incluyen el desarrollo embrionario, el crecimiento folicular, y la cicatrización de heridas, así como también en estados patológicos tales como el crecimiento tumoral y en enfermedades no neoplásicas que involucran una neovascularización anormal, que incluyen el glaucoma neovascular. Otros estados de enfermedad incluyen, pero no se limitan a, enfermedades neoplásicas, que incluyen pero no se limitan a tumores sólidos, enfermedades autoinmunitarias y enfermedades vasculares del colágeno tales como, por ejemplo, artritis reumatoide, y afecciones oftalmológicas tales como retinopatía diabética, fibroplasia retrolental y glaucoma neovascular. Las afecciones o enfermedades a las que la angiogénesis persistente o no controlada contribuyen se han denominado enfermedades dependientes de angiogénesis o asociadas con la angiogénesis.

Unos medios de control de dichas enfermedades y afecciones patológicas comprenden restringir el suministro de sangre a las células implicadas en la mediación o provocación de la enfermedad o afección. Por ejemplo, en el caso de una enfermedad neoplásica, los tumores sólidos se desarrollan hasta un tamaño de aproximadamente unos pocos milímetros, y el crecimiento adicional no es posible debido a la angiogénesis ausente dentro del tumor. En el pasado, las estrategias para limitar el suministro de sangre a los tumores han incluido la oclusión de vasos sanguíneos que suministran partes de órganos en los que los tumores están presentes. Estos enfoques requieren que el sitio del tumor sea identificado y, en general se limitan al tratamiento en un solo sitio, o un pequeño número de sitios. Una desventaja adicional de la restricción mecánica directa de un suministro de sangre es que se desarrollan vasos sanguíneos colaterales, a menudo de manera bastante rápida, lo cual restaura el suministro de sangre al tumor. Otros enfoques se han centrado en la modulación de los factores que están involucrados en la regulación de la angiogénesis. Si bien por lo general se encuentra en reposo, la proliferación endotelial vascular está altamente regulada, incluso durante la angiogénesis. Los ejemplos de factores que han sido implicados como posibles reguladores de la angiogénesis *in vivo* incluyen, pero no se limitan a, el factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ), el factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico ( $\alpha$ FGF y  $\beta$ FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

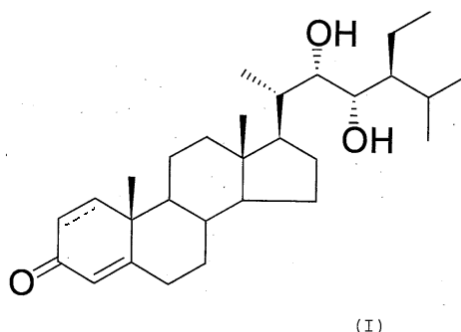
Los brasinoesteroides no se han utilizado como una molécula antiangiogénica; los brasinoesteroides son muy conocidos por su actividad antivírica y como agentes antiinflamatorios y antivíricos de acuerdo con las siguientes publicaciones:

La solicitud de patente europea EP 2178898 se refiere a brasinoesteroides que tienen actividad antiinflamatoria y antivírica que incluye los compuestos de fórmula (I) (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona (Compuesto 1) y (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmasta-1,4-dien-3-ona (Compuesto 2).

La publicación de Wachsman *et al.* (Curr. Med. Chem., Anti-Infective Agents, Antiviral Activity of Natural and Synthetic Brassinosteroids, 2004, Vol. 3, Núm. 2) se refiere a la actividad antivírica de los brasinoesteroides que incluye el compuesto (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona (Compuesto 1) incluido en la fórmula (I) (compuesto 32b de dicha publicación).

## Sumario de la invención

La presente invención se describe en las reivindicaciones adjuntas. Particularmente, la presente invención se refiere a una composición que comprende brasinoesteroides de la fórmula general (I)



en la que pueden ser un enlace sencillo o doble y las configuraciones de los átomos de carbono C22 y C23, respectivamente unidos a los sustituyentes HO son S para ambos átomos de carbono y un aditivo farmacéuticamente aceptable para su utilización en el tratamiento de un tumor sólido en un mamífero por medio de la inhibición de la angiogénesis, en la que el tumor sólido se selecciona de entre el grupo que consiste en un carcinoma de mama, un carcinoma de pulmón, un carcinoma de próstata, un carcinoma de colon, un carcinoma de ovario, un neuroblastoma, un tumor del sistema nervioso central, un glioblastoma multiforme y un melanoma.

En una forma de realización, la composición para su utilización en el tratamiento de un tumor sólido en un mamífero por medio de la inhibición de la angiogénesis, los brasinoesteroides de la fórmula general (I) se selecciona de entre:

(22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona (Compuesto 1) y (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmasta-1,4-dien-3-ona (Compuesto 2).

En otra forma de realización de la composición que comprende brasinoesteroides de la fórmula general (I) para su utilización en el tratamiento de un tumor sólido en un mamífero por medio de la inhibición de la angiogénesis, en la que el tumor sólido se selecciona de entre el grupo que consiste en un carcinoma de mama, un carcinoma de pulmón, un carcinoma de próstata, un carcinoma de colon, un carcinoma de ovario, un neuroblastoma, un tumor del sistema nervioso central, un glioblastoma multiforme y un melanoma, la composición comprende además un segundo agente activo para su utilización farmacéutica seleccionado de un antivírico, un antifúngico, un antibacteriano, un antiséptico, un antiinflamatorio o un inmunomodulador, un antineoplásico, un antiangiogénico y un analgésico.

En una forma de realización adicional de dicha composición, los agentes antiangiogénicos se seleccionan de entre el grupo que consiste en vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel, docetaxel, 5 FU, cisplatino, carboplatino, irinotecán, topotecán y ciclofosfamida.

### Descripción de las figuras

**Figura 1.** Efecto del Compuesto 1 sobre la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B inducida por HSV-1. Las células IOBA-NHC y HCLE se infectaron con HSV-1 (m.o.i = 1) en ausencia o presencia de 40  $\mu$ M de Compuesto 1. Se llevó a cabo una doble tinción IFI por medio de la adición de anticuerpos anti-p65 y anti-HSV-1 gD a células fijas de metanol. La translocación de NF- $\kappa$ B y la expresión de gD se analizaron por medio de microscopía confocal. (A y D) células infectadas; (B y E) células infectadas tratadas con 40  $\mu$ M de Compuesto 1; (C y F) células infectadas tratadas con 40  $\mu$ M de DEX.

Ampliación: NHC, 400X y HCLE, 600X.

**Figura 2.** Efecto del Compuesto 1 sobre la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 en células epiteliales. (A, B y D) Células IOBA-NHC y (C y E) HCLE infectadas por HSV-1 (m.o.i = 1) se trataron o no con 40  $\mu$ M de Compuesto 1 o DEX. Después de 24 h, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 se cuantificaron por medio de ELISA en los sobrenadantes celulares. \*  $p < 0,01$ , con respecto a las células infectadas no tratadas y a las células no infectadas no tratadas; \*\*  $p < 0,001$ , con respecto a las células infectadas no tratadas y a las células no infectadas no tratadas, \*\*\*  $p < 0,00001$ , con respecto a las células infectadas no tratadas y a las células no infectadas no tratadas.

**Figura 3.** A-F) translocación nuclear de NF- $\kappa$ B en macrófagos tratados con el Compuesto 1.

Las células J774A.1 se estimularon con LPS durante 8 h, y se trataron o no con 40  $\mu$ M de Compuesto 1 o DEX. La localización de p65 se detectó por medio de tinción con IFI en células fijas

de metanol. Ampliación: 400x. (A) Células de control; (B) Células no estimuladas tratadas con el Compuesto 1; (C) Células no estimuladas tratadas con DEX; (D) Células estimuladas con LPS; (E) Células estimuladas con LPS tratadas con el Compuesto 1; (F) Células estimuladas por LPS tratadas con DEX. (G) Secreción de IL-6 en macrófagos tratados con el Compuesto 1. Las células J774A.1 se estimularon con LPS durante 8 h, y se trataron o no a continuación con 40  $\mu$ M de Compuesto 1 o DEX. IL-6 se determinó por medio de ELISA en los sobrenadantes. \*  $p < 0,005$ , con respecto a las células estimuladas no tratadas y a las células no estimuladas no tratadas.

**Figura 4.** Efecto del Compuesto 1 sobre la expresión de VEGF en las células J774A.1 estimuladas con LPS e IL-6. Las células cultivadas en microplacas de 6 pocillos fueron transfectadas con pVEGF-LUC y pb-gal, como un control y, 24 h después de la transfección se estimularon con 100 ng/ml LPS o 1 ng/ml de IL-6. Después de 8 h de inducción con LPS y 16 h con IL-6, se recolectaron las células y la expresión de luciferasa se midió como un informante de la actividad del promotor de VEGF. Los valores de luciferasa se normalizaron a la actividad de b-gal. CC: células no transfectadas; N/S: células transfectadas no estimuladas; N/T: sin tratamiento. (\* y \*\*, significativamente diferente con respecto al control. Se informa de los valores de p en el texto).

**Figura 5.** Efecto del Compuesto 1 sobre la formación de tubo capilar en un Matrigel. Se sembraron células HUVEC en Matrigel polimerizado se observó (5 a 8 x 10<sup>4</sup> células/pocillo) en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de Compuesto 1. La placa se incubó a 37°C, y la formación de tubo en un microscopio óptico invertido. Las imágenes digitales fueron tomadas a las 24 h de incubación. Ampliación: 25X.

**Figura 6.** Efecto antiangiogénico del Compuesto 1 sobre la respuesta neovascular *in vivo* inducida por las células LMM3 en ratones BALB/c.

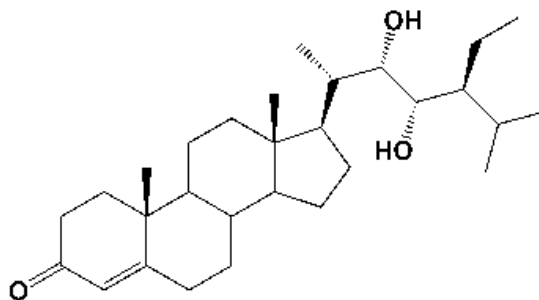
2x10<sup>5</sup> células/0,1 ml se inocularon en el costado de cada ratón BALB/c. Cinco días después de la inoculación, los animales fueron sacrificados y se tomaron fotografías del sitio de la inoculación. El panel superior muestra imágenes representativas de cada grupo experimental. En el gráfico, se muestra la densidad del vaso (vasos/mm<sup>2</sup>) de acuerdo con lo cuantificado para cada grupo +/- ES \*  $p < 0,001$  vs LMM3.

**Tabla 1.** Expresión génica diferencial en las células HCLE infectadas por HSV-1 y J774A.1 estimuladas con LPS y tratadas con el Compuesto 1. Células HCLE infectadas por HSV-1 (m.o.i. = 1) y J774A.1 se estimularon con 100 ng/ml de LPS, en ambos casos tratadas con 40  $\mu$ M del Compuesto 1 durante 6 h. La extracción de ARN total con Trizol y el análisis de perfiles de expresión génica de células humanas y de ratones a través de una micromatriz ("microarray") Agilent de dos colores.

### Descripción detallada de la invención

El virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) induce un síndrome inflamatorio ocular crónico llamado queratitis estromal herpética (HSK) que puede conducir a la ceguera. Esta inmunopatología se desarrolla como consecuencia de la llegada de las células inflamatorias a la córnea en respuesta a la infección a través de la aparición de nuevos vasos sanguíneos. Si bien las células inflamatorias son responsables de la eliminación de HSV-1 del ojo, provocan una respuesta inflamatoria no controlada que culmina en el desarrollo de la HSK.

El compuesto (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona (Compuesto 1) presenta la siguiente fórmula estructural:



Compuesto 1

El compuesto (22S, 23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona (Compuesto 1) ejerce una actividad antivírica en las células epiteliales derivadas del tejido ocular (HCLE y NHC) y reduce la incidencia de HSK en el modelo murino de infección ocular por HSV-1. Para estudiar una posible acción inmunomoduladora del compuesto que

explicaría la mejora de HSK murino, se investigó el efecto del Compuesto 1 en la modulación de células epiteliales e inmunitarias a diversos estímulos. El Compuesto 1 demostró provocar la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 en células epiteliales infectadas por el HSV-1 de origen ocular y, por otro lado, redujo de manera significativa la producción de TNF- $\alpha$  e IL 6 en macrófagos activados por LPS.

Las pruebas de micromatrices de ADN llevadas a cabo sobre muestras de células HCLE infectadas por HSV-1 y células J774A.1 estimuladas con LPS, ambas tratadas con el estigmastano, revelaron varios genes sobreexpresados y reprimidos asociados con la respuesta inmunitaria innata y procesos inflamatorios. Se ha corroborado el efecto inhibitor del compuesto 1 sobre las células inflamatorias activadas y una actividad inmunoestimulante en las células epiteliales infectadas.

El efecto proinflamatorio del Compuesto 1 en las células infectadas favorecería la activación de la respuesta inmunitaria innata responsable de eliminar el virus de las mismas. Además, inhibiría factores proinflamatorios y estimularía los mediadores antiinflamatorios en los macrófagos activados con LPS, lo que sugiere una acción inmunosupresora en células inflamatorias. El equilibrio entre los efectos pro y antiinflamatorios del estigmastano podría explicar la mejora de HSK en ratones infectados. Además, la mejora de los signos de neovascularización murina después del tratamiento con el Compuesto 1 también se atribuye a la inhibición de estructuras similares a capilares observadas *in vitro*.

Método de obtención del Compuesto 1: (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona

En un balón provisto de un refrigerante, en una atmósfera inerte, se disuelven 15 gramos de estigmasterol en 750 ml de anhídrido tolueno. Se añaden 25 ml de N-metil-4-piperidona; la mezcla se agita y se hierve hasta que se separan por destilación 50 ml de disolvente.

La mezcla se enfría a 60°C, y se añaden 7 gramos de isopropóxido de aluminio. La solución se somete a reflujo durante 3 horas, y se lleva a la temperatura ambiente y se lava sucesivamente con 200 ml de ácido clorhídrico acuoso al 5%, 100 ml de bicarbonato de sodio acuoso y finalmente agua. El tolueno se evaporó a presión reducida y el sólido resultante se recristaliza en metanol. Se obtienen 12,3 gramos de (22E)-stigmast-4-en-3-ona, con un punto de fusión de 127 a 128°C.

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

La solución resultante se calienta a 50°C durante 24 horas y se lleva a la temperatura ambiente. Se añaden 12 gramos de bisulfato de sodio disuelto en 100 ml de agua. El volumen de disolvente 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 bruto se purifica por cromatografía en columna de sílice (disolvente de elución: hexano/acetato de etilo 1:1). Se obtienen 8,9 gramos de (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona.

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): 5,72 (1H, s, H-4); 3,61 (2H, m, H-22 y H-23).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 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<sup>-1</sup>.

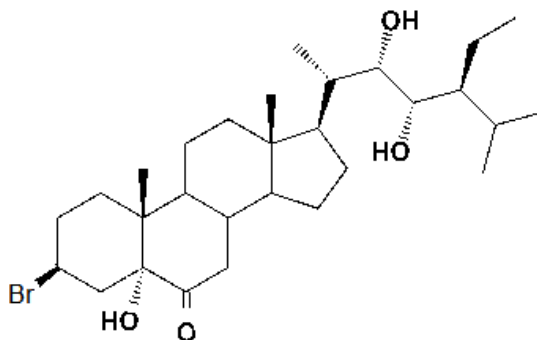
## Ensayos:

### 1. Introducción

La queratitis estromal herpética (HSK) resulta de una infección con virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) en la córnea. El inicio de la enfermedad requiere la replicación vírica en las células epiteliales, y su progresión puede conducir a la ceguera. De hecho, la morbilidad visual resulta de la queratitis recurrente, lo que provoca la cicatrización corneal, el adelgazamiento y la neovascularización debido a la respuesta inmunitaria a los virus. La capacidad de HSV-1 para provocar la enfermedad del estroma corneal correlaciona con su facilidad para inducir la vascularización corneal. La invasión de la córnea por medio de PMN a través de los nuevos vasos ayuda a eliminar el virus, pero, al mismo tiempo, habilita la entrada a diversas citocinas y factores angiogénicos secretados por las células inflamatorias. La patogénesis de la cicatrización de la córnea y la vascularización es incierta, pero parece ser una compleja interacción de diversas citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, tales como interleucina (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, IL-12, IL-17, interferón (IFN)- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-2, proteínas quimiotácticas de monocitos (MCP)-1, IL-12 y MIP1- $\alpha$ , factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la metaloproteinasas de matriz (MMP)-9, ya sea traídos por las células inflamatorias o localmente liberados por las células infectadas y vecinas en la respuesta temprana a la infección por HSV-1.

Anteriormente se ha informado de que los derivados estigmastano polifuncionalizados tienen actividad antivírica contra varios virus patógenos *in vitro* y, en particular, previenen la multiplicación de HSV-1 y la propagación vírica en líneas de células tanto corneales como conjuntivales humanas, sin citotoxicidad. Uno de estos compuestos, (22S, 23S)-3β-bromo-5α,22,23-trihidroxiestigmastan-6-ona, designado también como el Compuesto 6b en la publicación de Wachsmann *et al.* (Curr. Med. Chem., Anti-Infective Agents, Antiviral Activity of Natural and Synthetic Brassinosteroids, 2004, Vol. 3, Núm. 2), disminuye de manera significativa la incidencia de HSK en el modelo murino de la infección corneal por HSV-1, probablemente debido a un efecto inmunomodulador, ya que no ejercen una actividad anti-HSV-1 *in vivo*.

El Compuesto 6b presenta la siguiente fórmula estructural:



Compuesto 6b

Además, este derivado de estigmastano dificulta la producción de TNF-α en macrófagos estimulados con LPS *in vitro* y modula la secreción de IL-6 y TNF-α en las células epiteliales humanas derivadas de los tejidos oculares. Con el fin de mejorar la actividad inmunomoduladora de este tipo de moléculas, se diseñaron análogos de estigmastano, pero manteniendo la cadena lateral de (22S,23S)-22,23-dihidroxilada de la estructura esteroidea y proporciona anillos A y B, con características estructurales similares a las del fármaco antiinflamatorio comercial Dexametasona (DEX). Se descubrió que uno de estos análogos de estigmastano sintetizados, (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona, designado como el Compuesto 1, también evita la multiplicación y propagación vírica de HSV-1 en células conjuntivales y de la córnea humana, sin citotoxicidad, con índices de selectividad (SI) de 13,2 y 9,3, respectivamente.

Se ha observado que este estigmastano disminuye de manera significativa la incidencia y la gravedad de HSK en el modelo murino de infección corneal por HSV-1, no sólo en la presencia de virus de replicación como lo hace el estigmastano 6b (o el Compuesto 6b), sino también cuando la replicación vírica ya había provocado la respuesta inmunitaria. Por lo tanto, el Compuesto 1 resultó ser interesante como un futuro fármaco para el tratamiento de HSK dado que su potencial de curación también se debería a un efecto inmunomodulador. Por el contrario, el Compuesto 1 no se comportaría como un fármaco antiinflamatorio esteroideo convencional, como DEX, ya que contiene de manera significativa los signos de queratitis cuando se administra durante los primeros 3 días después de la infección por HSV-1, mientras que DEX exacerba el daño ocular.

En un intento por explicar la mejora de HSK murino mencionado anteriormente, se evaluó el papel del Compuesto 1 tanto como un modulador de la respuesta inmunitaria a la infección vírica y a un estímulo no vírico, y como un fármaco antiangiogénico *in vitro*.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Células, virus y soluciones de tratamiento

Se cultivó la estirpe celular humana IOBA-NHC en un medio modificado de Dulbecco y una mezcla de nutrientes F12 (DMEM/F12, 1:1), suplementado con 10% de FBS inactivado (DMEM/F12, 10%), y se mantuvo en DMEM/F12 suplementado con 2% de FBS inactivado (DMEM/F12, 2%).

Las células epiteliales de la córnea-limbo humanas (HCLE) fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Ilene K. Gipson y el Dr. Pablo Argüeso (The Schepens Eye Research Institute, Harvard Medical School, Boston, USA) y se cultivaron en un medio libre de suero de queratinocitos GIBCO, suplementado con 25 µg/ml de extracto de pituitaria bovina (BPE), 0,2 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y 0,4 mM de CaCl<sub>2</sub>, y se mantuvieron en DMEM/F12 con bajo calcio.

La estirpe celular de macrófagos murinos J774A.1 fue proporcionada amablemente por el Dr. Osvaldo Zabal (INTA, Castelar, Buenos Aires) y se cultivó en un medio de RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS inactivado

(RPMI 10%) y se mantuvieron en RPMI suplementado con 2% de FBS inactivado (RPMI 2%).

Se obtuvieron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) de Invitrogen Argentina S.A., Buenos Aires, Argentina, y se propagaron y se mantuvieron en un medio 200 suplementado con LSGS.

La cepa KOS de HSV-1 se propagó a baja multiplicidad y se utilizó para los experimentos *in vitro*.

El Compuesto 1 se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y se diluyó con medio de cultivo. La concentración máxima de DMSO probado fue de 1% y no mostró citotoxicidad en condiciones experimentales.

La dexametasona 0,4% (DEX) se adquirió en Sidus, Argentina.

## 2.2. Ensayo de citotoxicidad

Se determinó la viabilidad celular de acuerdo con expuesto anteriormente. La absorbancia de cada pocillo se midió en un lector de microplacas MPR-A 4i Eurogenetics utilizando una longitud de onda de ensayo de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm. Los resultados se expresaron como un porcentaje de la absorbancia de las células tratadas con respecto a las no tratadas. La CC50 se define como la concentración del compuesto que provocó la reducción de 50% en la viabilidad celular.

## 2.3. Inmunofluorescencia indirecta

Se infectaron células IOBA-NHC y HCLE en monocapas cultivadas en cubreobjetos en placas de 24 pocillos con 0,2 ml de HSV-1 KOS (m.o.i. = 1) y se incubaron 1 h a 37°C. A continuación, los inóculos se retiraron y las células se recubrieron con un DMEM/F12 sin SFB, durante 24 h a 37°C.

Se cultivaron células J774A.1 en cubreobjetos en placas de 24 pocillos y se estimularon con 100 ng/ml LPS (Sigma) en medio RPMI sin SFB, durante 8 h a 37°C.

Después de la incubación, las células se fijaron en metanol a -20°C durante 10 min, y se procesaron para inmunofluorescencia indirecta (IFI) con anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína D (gD) del HSV-1 y/o la subunidad p65 de NF-κB. Después de tres lavados con PBS, los cubreobjetos se invirtieron sobre una gota de una dilución 1/100 del primer anticuerpo, monoclonal de ratón anti-gD y/o policlonal de conejo anti p65 (Santa Cruz Biotechnology) y se incubó durante 30 min a 37°C, y después se sometió a tres lavados adicionales con PBS. A continuación, los cubreobjetos se incubaron con una dilución 1/50 de los segundos anticuerpos, IgG policlonal de cabra antiratón de FluoroLink™ CyTM3 y/o IgG policlonal de conejo anticabra conjugado con FITC (Sigma Aldrich) durante 30 min a 37°C.

Por último, los cubreobjetos se lavaron primero con PBS y después con agua destilada, se montaron con glicerina tamponada y se observaron bajo un microscopio Zeiss con óptica de epifluorescencia o un microscopio confocal Olympus FB300.

## 2.4. Análisis cuantitativo de la fluorescencia

Las imágenes obtenidas con una magnificación de 40X se importaron en el programa NIH Image J 1.34s (diseñado por Wayne Rasband, NIMH, Bethesda). Las imágenes de inmunofluorescencia se convirtieron en una escala de grises de 8 bits de 0 (negro) a 255 (blanco). Se analizó la fluorescencia total y nuclear de las células individuales y se obtuvo una densidad media de fluorescencia para cada una. Para comparar la distribución de la fluorescencia dentro de la célula, los resultados se analizaron en una hoja de cálculo (Excel®). La intensidad total de fluorescencia o densidad nuclear se calculó como la media total o nuclear por área total o nuclear, respectivamente. Entonces, se calculó el porcentaje de intensidad nuclear o el porcentaje de intensidad nuclear con respecto a la intensidad total para cada celda. Se procesaron las células no estimuladas para establecer un valor de referencia de la fluorescencia nuclear (valor de corte).

## 2.5. Determinación de citocinas

Las células IOBA-NHC y HCLE cultivadas en placas de 24 pocillos se infectaron por HSV-1 (m.o.i. = 1), por duplicado. Después de 24 h de incubación a 37°C, se recolectaron los sobrenadantes, se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min, y las citocinas se cuantificaron por medio de ELISA. TNF-α humano, IL-6 e IL-8 se cuantificaron por medio de conjuntos ELISA comerciales (BD OptEIA™, Becton Dickinson, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las células J774A.1 cultivadas en placas de 24 pocillos se incubaron a 37°C con 100 ng/ml de LPS, por duplicado. Después de 8 h, los sobrenadantes se recolectaron y la IL-6 murina se cuantificó por medio de conjuntos ELISA comerciales (BD OptEIA™, Becton Dickinson, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.



## 2.6. Procedimientos de micromatriz

5 Se analizaron células infectadas por HSV-1 y células estimuladas con LPS de manera transcripcional utilizando una micromatriz de todo el genoma humano y una micromatriz de todo el genoma de ratón (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), que corresponde a 41.000 genes y transcripciones humanas o de ratones.

### 2.6.1. Determinación de perfiles de expresión génica

10 El ARN se extrajo con cloroformo/isopropanol y se purificó a partir de Trizol. Las muestras procesadas se cuantificaron en un espectrofotómetro (NanoDrop), que presenta un alto contenido de ARN total (1800 y 3100 ng/ml), y una buena calidad sin degradación, de acuerdo con los gráficos obtenidos de la Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

15 La síntesis de ADNc, la amplificación y el etiquetado de ARNc se llevó a cabo, siguiendo el protocolo de dos colores de Agilent. Cianina: ARNc con marcado 3-CTP y 5-CTP, se preparó a partir de ARN purificado (Análisis de Expresión Génica Basado en micromatriz de dos colores - Quick Amp Labeling, Agilent). El ARNc marcado se purificó, se cuantificó y se determinó la eficacia del etiquetado.

20 Después de eso, se procedió a la hibridación, el lavado, el montaje de los chips y la exploración. El software del escáner (Extracción de características) llevó a cabo el control de calidad de exploración. Los datos de intensidad de fluorescencia obtenidos para cada chip se analizaron por el uso de programas GeneSpring XG11 y visualizador de experimentos múltiples (MeV)

25 Las muestras marcadas se colocaron en los chips de hibridación humanos y de ratón para las células HCLE y J774A.1, respectivamente, durante 17 h a 60°C. Los lavados sucesivos se llevaron a cabo con diferentes soluciones de lavado, estabilización y secado, y las muestras fueron escaneadas en el escáner Agilent G2565BA.

### 2.6.2. Análisis de imágenes

30 Se utilizó el software comercial de Agilent de extracción de características para el control de calidad de la exploración. El software convierte las imágenes escaneadas producidas en datos cuantitativos para su posterior análisis. Calcula los errores asociados con la hibridación, el lavado y la exploración y detecta los valores atípicos. Por un lado, lleva a cabo un análisis de la imagen para localizar la red en el chip y en ella, los puntos para cada gen, y por el otro lado, analiza los datos, para definir y medir la información (intensidad de fluorescencia) de cada punto, para el análisis de la expresión génica.

### 2.6.3. Análisis de los datos

40 Se identificaron los genes expresados de manera diferencial con significación estadística. Se han utilizado dos programas, el XG11 y GeneSpring y el visualizador de experimentos múltiples (MeV).

## 2.7. Expresión del VEGF

45 Los vectores de expresión pVEGF-LUC (codificación de luciferasa de luciérnaga) y p $\beta$ -gal fueron amablemente donados por los miembros del grupo de investigación del Dr. Arzt (FCEyN, UBA, Argentina).

50 Las células J774A.1 cultivadas hasta la confluencia en 6 pocillos de microplacas fueron transfectadas con 0,5 g de pVEGF-Luc y p $\beta$ -gal de plásmidos diluidos en el medio Opti MEM, sin suero y antibióticos, y en presencia de lipofectamina (Lipofectamina de ADN, TM 2000) como reactivo para transfección, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 4 a 6 h de incubación a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, el medio se desechó y se sustituyó por un fresco Opti MEM con 10% de FBS, sin antibióticos, y se incubó a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h.

55 El medio se desechó y las células se estimularon con 100 ml de LPS/NG y 1 ng/ml de IL-6 en medio Opti MEM con 10% de FBS. Después de 8 h y 16 h de estimulación, el medio se desechó y las células se levantaron por desguace en 0,1 ml por pocillo de tampón de lisis 1X. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

60 Con el fin de medir la actividad luciferasa, 20  $\mu$ l de cada muestra se mezclaron con 80  $\mu$ l de sustrato para la luciferasa de luciérnaga y se midieron en un luminómetro. En las mismas muestras, se midió la actividad de  $\beta$ -gal en microplacas de 96 pocillos. Para ello, 20  $\mu$ l de cada muestra se mezclaron con 80  $\mu$ l de sustrato para la  $\beta$ -galactosidasa y se incubaron a 37°C hasta que se desarrolló el color. Las absorbancias de estas mezclas se leyeron en un lector de ELISA a 450 nm.

65

Se determinó la expresión de luciferasa como un informante de los valores de la actividad del promotor de VEGF obtenidos por la normalización de la actividad  $\beta$ -gal contra para cada muestra.

### 2.8. Formación de tubo capilar en un matrigel

La formación de estructuras similares a tubos capilares por las células HUVEC fue analizada en placas de cultivo celular de 24 pocillos recubiertas con una matriz de la membrana extracelular (Matrigel; BD Biosciences).

El Matrigel se descongeló a 4°C. Utilizando placas y puntas preenfriadas, se distribuyeron 100  $\mu$ l/pocillo de Matrigel y se dejó gelificar a 37°C durante por lo menos 30 min. Las células se sembraron en el Matrigel polimerizado (5 a 8 x 10<sup>4</sup> células/pocillo). La placa se incubó a 37°C, y se observó la formación de tubo en un microscopio invertido óptico. Las imágenes digitales fueron tomadas en diferentes momentos con una cámara. Las estructuras tubulares se cuantificaron por recuento manual de campos de baja potencia (25X) y el porcentaje de inhibición se expresó utilizando pocillos no tratados como 100%.

### 2.9. Ensayo de invasión de células

La invasión de HUVEC se evaluó utilizando 24 pocillos Transwell de cámaras de cultivo de células con insertos de filtro de poro de policarbonato de 8  $\mu$ m. Las HUVEC cultivadas se trataron con tripsina y se suspendieron en medio 200 suplementado con LSGS a una concentración de 8 x 10<sup>5</sup> células/ml. Se aplicó un total de 4 x 10<sup>4</sup> de suspensión de células para insertar filtros. Se utilizaron 100 ng/ml de IL-6 para estimular la migración celular a través de las inserciones. Para eso, se distribuyeron 600  $\mu$ l de medio solo o con el estímulo en la cámara inferior, que después se incubó durante 24 h a 37°C para permitir la migración celular. El inserto se retiró y las células migradas en los pocillos se fijaron y tiñeron con cristal violeta. Los pocillos se examinaron con un microscopio. La migración se cuantificó por medio de la medición de las células teñidas en total en cada pocillo.

### 3.0. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba t de Student para el análisis estadístico de todos los datos.

## **Resultados**

### 1. Actividad inmunomoduladora del Compuesto 1 en células epiteliales infectadas por HSV-1

#### 1.1. La activación de NF- $\kappa$ B no resulta afectada por el Compuesto 1 después de la infección por HSV-1

La mejora de ratones con HSK cuando son tratados con el Compuesto 1 no parece estar relacionada ya sea con un aclaramiento vírico temprano o con un efecto antiinflamatorio del compuesto comparable al observado después del tratamiento con DEX en el inicio de la enfermedad. Por lo tanto, se especuló que el efecto ejercido por el estigmastano estaría involucrado en la respuesta inmunitaria innata que aparece durante las primeras etapas de la infección por HSV-1. Dado que HSV-1 puede activar NF- $\kappa$ B, se investigó el efecto del Compuesto 1 sobre la localización intracelular de la subunidad NF- $\kappa$ B p65. Para ese propósito, se infectaron células IOBA-NHC y HCLE por HSV-1 (m.o.i. = 1) y se trataron o no con el Compuesto 1 (40  $\mu$ M). Una tinción doble de IFI se llevó a cabo por medio de la adición de anticuerpos anti-p65 y anti-HSV-1 gD con el fin de visualizar gD como un marcador de la infección viral.

Se descubrió que la mayoría de las células IOBA-NHC y HCLE infectadas exhibieron fluorescencia p65 en los núcleos (85,9% y 72,5%, respectivamente) (figura 1A y D). La mayoría de ellas agrupadas en los focos de HSV-1 característicos que muestran la fluorescencia p65 nuclear asociada con la tinción de gD. Cuando se añadió el Compuesto 1, el porcentaje de células que muestran la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo se redujo a 22,2  $\pm$  1,2% en las células IOBA-NHC (figura 1B) y 5,7% en las células HCLE (figura 1E). En presencia del compuesto, el número de células con fluorescencia p65 nuclear disminuye de manera considerable, por coincidencia con la aparición limitada de menos focos y dispersos que expresan gD. El Compuesto 1 inhibe la translocación de NF- $\kappa$ B, aunque este efecto podría ser atribuido a su efecto anti-HSV-1. Por otro lado, el tratamiento con DEX no impidió la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B en ninguna de las células infectadas por HSV-1 (figura 1C y F).

#### 1.2. Modulación de la producción de citocinas por el Compuesto 1 en las células epiteliales infectadas

Las células de la córnea son la primera línea de defensa contra HSV-1 y, junto con las células de la conjuntiva, liberan citocinas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-6, asociadas con la eliminación del agente infeccioso. Además, NF- $\kappa$ B está estrechamente relacionado con la producción de estas y otras citocinas proinflamatorias después de la inducción con diversos estímulos.

Por lo tanto, para analizar de manera adicional la actividad inmunomoduladora del estigmastano, se estudió su efecto sobre la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 en ambos tipos celulares.

Las células IOBA-NHC y HCLE infectadas por HSV-1 (m.o.i. = 1) se trataron o no con 40  $\mu$ M de Compuesto 1 y DEX. Después de 24 h, los sobrenadantes de células se recogieron y TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 se cuantificaron por medio de ELISA.

5 El Compuesto 1 no indujo la liberación de TNF- $\alpha$  por sí mismo en las células tratadas no infectadas. Además, las células HCLE fallaron al producir TNF- $\alpha$  de manera independiente a si los sobrenadantes pertenecían a las células infectadas por HSV-1 o las células infectadas por HSV-1 y tratadas, mientras que las células IOBA-NHC eran débiles productoras de TNF- $\alpha$ . Las células no infectadas produjeron 40,9 pg/ml de la citocina, mientras que la infección por HSV-1 elevó el rendimiento de TNF- $\alpha$  a 77,1 pg/ml ( $p < 0,01$ ) (figura 2A). DEX eliminó la producción de TNF- $\alpha$  en las células IOBA-NHC infectadas por HSV-1 por completo, mientras que el Compuesto 1 no afectó la producción de TNF- $\alpha$  (figura 2A).

El patrón de la expresión de IL-6 inducida por HSV-1 varió dependiendo del tipo celular.

15 La producción de IL-6 fue diez veces mayor en las células IOBA-NHC infectadas que la detectada en las células HCLE (figuras 2B y C). Debe apreciarse que el Compuesto 1 no provocó ningún cambio en la liberación de IL-6 de ningún tipo de células infectadas con respecto a células de control infectadas, mientras que el nivel de IL-6 se redujo de manera considerable después del tratamiento con DEX. El Compuesto 1 no indujo la liberación de IL-6 por sí misma en las células tratadas no infectadas.

20 Las células IOBA-NHC y HCLE muestran altos niveles basales de secreción de IL-8 ( $522,5 \pm 23$  pg/ml y  $133,8 \pm 0,6$  pg/ml, respectivamente) que aumentaron de manera considerable después del tratamiento con el Compuesto 1 solo ( $p < 0,01$ ) (figura 2D y E; datos no representados). La infección por HSV-1 provocó una reducción de la secreción de IL-8 en células IOBA-NHC a  $252 \pm 7,8$  pg/ml ( $p < 0,001$ ), las células HCLE infectadas mostraron un aumento bajo pero significativo en la secreción de IL-8, de  $133,8 \pm 0,6$  pg/ml a  $142,9 \pm 0,5$  pg/ml ( $p < 0,01$ ). El tratamiento de células infectadas con el Compuesto 1 indujo un aumento significativo de IL-8 con respecto a las células IOBA-NHC y HCLE no tratadas infectadas ( $471,8 \pm 30$  pg/ml,  $p < 0,001$  y  $163,6 \pm 0,4$  pg/ml,  $p < 0,00001$ , respectivamente). A diferencia del Compuesto 1, DEX redujo de manera ligera, pero significativa, la secreción de IL-8 tanto en células conjuntivales y de la córnea tanto no infectadas como infectadas ( $p < 0,001$ ) (figura 2D y E).

30 En resumen, el Compuesto 1 demostró provocar la liberación de citocinas proinflamatorias en células epiteliales infectadas por HSV-1 de origen ocular, mientras que DEX produjo un efecto como un fármaco antiinflamatorio, lo que revela un comportamiento diferente de ambos compuestos que están relacionados de manera estructural.

## 35 2. Actividad inmunomoduladora del Compuesto 1 en las células J774A.1 activadas

### 2.1. El Compuesto 1 elimina la secreción de IL-6 a partir de células J774A.1 activadas

40 Los macrófagos están implicados en la respuesta inflamatoria en el ojo durante el desarrollo de HSK. Estas células no están presentes en la córnea sana, pero se han detectado en esta región del ojo después de la infección experimental de ratones con HSV-1. La contribución de los macrófagos en la amplificación de la respuesta inflamatoria se produce a través de la secreción de moléculas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$  e IL-6.

45 Ya se ha demostrado que el Compuesto 1 es eficaz para disminuir la secreción de TNF- $\alpha$  en macrófagos activados incluso más que DEX, dado que el valor de la concentración inhibitoria de 50% (IC<sub>50</sub>) para el Compuesto 1 fue de 7  $\mu$ M, y 48  $\mu$ M de DEX (manuscrito en preparación). Este resultado llevó a evaluar el efecto del compuesto sobre la secreción de IL-6.

50 Los macrófagos no estimulados exhibieron una producción basal de 100 ng/ml de IL-6, mientras que 100 ng/ml de LPS plantearon los niveles a una concentración de  $1.146,8 \pm 25,9$  pg/ml de esta citocina (figura 3G).

55 El Compuesto 1 ejerce una fuerte inhibición del rendimiento de IL-6, ya que su nivel se redujo de manera significativa a  $838 \pm 4,2$  pg/ml ( $p < 0,005$ ) en macrófagos activados con respecto a las células de control no tratadas (figura 3G). En el caso del tratamiento con DEX, la producción de IL-6 también fue restringida ( $637,1 \pm 3,8$  pg/ml;  $p < 0,005$ ) (figura 3G).

### 2.2. La activación NF- $\kappa$ B no es inducida por el Compuesto 1 en las células J774A.1 estimuladas

60 Para verificar si la reducción en la secreción de citocinas ejercida por el Compuesto 1 estaba asociada con un bloqueo en la activación de NF- $\kappa$ B, se evaluó el efecto del compuesto sobre la translocación nuclear de la subunidad p65 en los macrófagos.

65 Después de 8 h de estimulación con LPS, se detectó p65 en el núcleo de la mayoría de las células, mientras que las células no estimuladas mostraron una localización citoplasmática (figuras 3D y 3A). Se detectó p65 en los núcleos de las células tratadas y estimuladas, lo que indica que el Compuesto 1 no impidió la translocación de

NF-κB (figura 3E). El análisis semicuantitativo de las imágenes mostró una fluorescencia nuclear basal de  $33,6 \pm 8,7\%$  en los macrófagos no estimulados. Un porcentaje de  $79,4 \pm 1,2$  de las células estimuladas con LPS exhibió un valor de fluorescencia nuclear por encima de la basal, lo que significaba positivo para la translocación de NF-κB al núcleo. La activación de NF-κB se evidenció en  $87,9 \pm 0,2\%$  de los macrófagos inducidos con LPS y tratados con el Compuesto 1.

De manera inesperada, el tratamiento con DEX no tuvo éxito en la prevención de la translocación de NF-κB, dado que el 100% de las células mostró fluorescencia p65 en el núcleo, a diferencia de los resultados descritos por Lavagno *et al.* (2004) (figura 3F).

Sin embargo, es notable que el p65 localizado en los núcleos, incluso cuando las células estimuladas con LPS fueron tratadas ya sea con el Compuesto 1 o DEX, mostró una reducción en la secreción de ambos mediadores de IL-6 y TNF-α (figura 3G).

### 3. La expresión de genes en las células epiteliales e inflamatorias resulta afectada por el Compuesto 1

Dado que el compuesto 1 demostró comportarse como un inmunomodulador *in vitro* de manera independiente de los estímulos utilizados (víricos o no víricos), se investigó si estos hallazgos se correlacionaban con una expresión génica de células alteradas. Para este propósito, células epiteliales infectadas e inflamatorias se procesaron para obtener muestras de ARN. Las células HCLE infectadas por HSV-1 (m.o.i. = 1) y células J774A.1 estimuladas con LPS (100 ng/ml) se trataron o no con 40 μM del Compuesto 1. Para extraer el ARN total, se recolectaron las células con Trizol a las 6 h p.i. y a las 6 h posinducción de LPS. Se obtuvieron ocho réplicas de HSV-1 en las células infectadas y estimuladas con LPS (cuatro de 'control' cada una) y otras ocho, a partir de células infectadas y estimuladas con LPS tratadas con el Compuesto 1 (cuatro 'tratadas' cada uno).

De acuerdo con el análisis de Ontología de Genes llevado a cabo por el programa de Gene Spring, se llegó a la conclusión de que el Compuesto 1 provocó la activación o inhibición de procesos inflamatorios o procesos relacionados con la respuesta inmunitaria innata, evidenciada por los genes expresados de manera diferencial a partir de células epiteliales infectadas por HSV-1 y células inflamatorias estimuladas con LPS. La Tabla 1 ilustra los genes que se encontraron más relevantes para el análisis.

Los resultados mostraron que el Compuesto 1 indujo la sobreexpresión de IL-1α, IL-8 y CXCL-2 en células HCLE infectadas por HSV-1, en comparación con controles infectados y no tratados (Tabla 1).

La infección corneal por HSV-1 induce la secreción de IL-1α. IL-1α, a su vez, induce la producción de CXCL-2 en las células residentes de la córnea. Otras quimiocinas tales como IL-8 (CXCL-8) son secretadas por las células de la córnea después de la infección por HSV-1. Tanto CXCL-2 como IL-8 son potentes quimioatrayentes para PMN. Las PMN son las células inflamatorias predominantes en el infiltrado de la córnea los primeros días después de la infección por HSV-1, y están involucradas en la eliminación del virus infeccioso del ojo. Por lo tanto, el Compuesto 1 favorecería la secreción de citocinas y quimiocinas que estimulan el reclutamiento de PMN después de la infección por HSV-1.

Se ha observado además la sobreexpresión del factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-2) en células HCLE infectadas tratadas con el Compuesto 1, con respecto a los controles infectados no tratados (Tabla 1). CSF-2 es uno de los reguladores clave de la función efectora tanto de neutrófilos maduros como de macrófagos. Retrasa la apoptosis de estas células e induce la liberación de enzimas proteolíticas y radicales libres de oxígeno en ellos.

Por lo tanto, el efecto proinflamatorio del Compuesto 1 observado *in vitro* provocaría la respuesta inmunitaria innata responsable de la eliminación del virus *in vivo*.

Por otro lado, hubo una sobreexpresión de los genes para IL-12, IL-23 y CXCL10, en macrófagos estimulados con LPS tratados con el Compuesto 1, en comparación con macrófagos estimulados no tratados (Tabla 1). Se ha demostrado que la IL-12 inhibe de manera directa la angiogénesis o lo hace de manera indirecta, a través de la inducción de IFN-α, que, a su vez, activa CXCL10, con una actividad antiangiogénica muy conocida. IL-12 e IL-23 tienen una de sus subunidades en común, IL-12, p40 o IL-12b. IL-23 utiliza muchos de los mismos componentes de transducción de señales que IL-12. Esto puede explicar las acciones similares de IL-12 e IL-23 en la promoción de la inmunidad celular y las respuestas proliferativas en las células diana. En las células estimuladas con LPS tratadas con el Compuesto 1, la expresión tanto de IL-10 como de Socs2 también aumentó en comparación con el control no tratado (Tabla 1). La proteína Socs2 es un mediador antiinflamatorio que bloquea las vías de NF-κB y JAK-STAT, para inhibir de este modo la liberación de citocinas proinflamatorias tales como TNF-α, IL-6 e IL-8. IL-10 por sí misma exhibe propiedades antiinflamatorias, y uno de sus efectos es la inducción de la expresión de proteínas Socs2.

Además, tanto ATF3 como TLR4 se sobreexpresan en las células J774A.1 estimuladas con LPS y tratadas con el Compuesto 1 (Tabla 1). ATF3 muestra un papel antiinflamatorio. Este factor se activa a través de TLR4 y a

continuación inhibe la inducción de genes estimulados por los mismos TLR.

ATF3 interviene como un regulador negativo de la respuesta inflamatoria en los macrófagos por antagonizar respuestas inducidas por NF-κB.

La expresión del gen DUSP2 también fue restringida después del tratamiento de los macrófagos activados por LPS con el Compuesto 1 (Tabla 1). Es bien conocido que la familia de proteínas DUSP regula la actividad de MAPK, crítico en la activación de la respuesta inflamatoria y la función inmunológica celular. Si bien las DUSP son fosfatasa que inactivan MAPK, se ha demostrado que la ausencia de expresión Dusp2 provoca una disminución en la producción de citocinas proinflamatorias.

Por lo tanto, el Compuesto 1 inhibiría factores proinflamatorios y estimularía las moléculas antiinflamatorias en macrófagos activados con un estímulo no vírico, lo que sugiere una acción inmunosupresora sobre las células inflamatorias.

En conclusión, el Compuesto 1 ejerce una actividad inmunomoduladora, dependiendo del tipo de célula en cuestión. En el caso de células HCLE infectadas por HSV-1, el compuesto no afecta los niveles de TNF-α e IL-6 e induce un aumento en la cantidad de IL-8. Por el contrario, el estigmastano provoca una caída en las cantidades de citocinas en los macrófagos activados con LPS.

A través de ensayos de micromatrices, se confirmó el efecto inhibitor del compuesto 1 sobre las células inflamatorias activadas, del que carece en el caso de las células infectadas tratadas. Además, el Compuesto 1 representó una actividad inmunoestimulante en las células epiteliales infectadas por HSV-1.

#### 4. El Compuesto 1 afecta a la expresión de VEGF

IL-6 es un agente angiogénico potente que ejerce su acción por medio de la estimulación de la producción de VEGF, el principal factor de crecimiento responsable de la angiogénesis y, en ciertos casos, un mediador importante de los procesos de angiogénesis patológica.

En el caso de HSK, IL-6 producido por las células de la córnea no infectadas primero, y a continuación por las células inflamatorias, conduciría la secreción de VEGF en las córneas infectadas.

Sin embargo, la principal fuente de VEGF no es las células infectadas, sino las no infectadas adyacentes a ellas. Por otro lado, cuando las córneas de ratones infectados por HSV-1 se tratan con antagonistas de VEGF, se observa una reducción parcial pero significativa de la angiogénesis, así como también la incidencia y gravedad de las lesiones de queratitis.

Dado que el Compuesto 1 redujo la incidencia y la severidad de la neovascularización en córneas de ratones infectadas y tratadas desde el día 1 p.i. en adelante, y también cuando se administra en la aparición de la enfermedad, a los 6 días p.i. (datos no representados), se estudió si el estigmastano ejerció algún efecto sobre la secreción de VEGF.

Para ello, las células J774A.1 fueron transfectadas con un plásmido informador VEGF LUC y un plásmido β-galactosidasa (β-gal) como control de transfección.

Ya que se había observado que la estimulación de células J774A.1 con LPS dio lugar a un aumento de la secreción de IL-6 (figura 3G), se decidió inducir la expresión de VEGF-LUC en células J774A.1 con el estímulo directo de IL-6 y la estimulación indirecta de LPS. Se detectaron los niveles más altos de expresión de VEGF después de 8 h y 16 h de la estimulación con LPS e IL-6, respectivamente.

De este modo, las células J774A.1 cultivadas en microplacas de 6 pocillos fueron transfectadas con plásmidos pVEGF-Luc y pβ-gal. A las 24 h postransfección, las células se estimularon con 100 ng/ml de LPS y 1 ng/ml de IL-6, en ausencia y en presencia de 40 mM del Compuesto 1. A continuación, se midió la expresión de VEGF y β-gal en las muestras recolectadas y se determinó la expresión de luciferasa como informante de la actividad del promotor de VEGF, por medio de la normalización de los valores obtenidos con los de la actividad de β-gal. En ausencia de los estímulos, las células J774A.1 mostraron una expresión basal de VEGF/β-gal de  $13307,5 \pm 3372,3$ . El Compuesto 1 solo no indujo la expresión de VEGF, ya que no se observaron diferencias significativas entre su expresión del valor de referencia y la obtenida en presencia del compuesto (figura 4).

Cuando las células fueron estimuladas ya sea con LPS o IL-6, se observó un aumento significativo en la expresión de VEGF con respecto a los controles no estimulados ( $93201,5 \pm 26770,4$ ,  $p < 0,1$ , y  $30929,5 \pm 5464$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente). En ambos casos, el Compuesto 1 fue efectivo en la disminución considerable de la expresión de VEGF, ya que se redujo a  $22098,5 \pm 4052,4$  ( $p < 0,1$ ) y  $17900 \pm 2689,7$  ( $p < 0,05$ ) después de la inducción con LPS e IL-6, correspondientemente.

### 5. El Compuesto 1 interviene en la formación de tubo capilar y la invasión de células *in vitro*

Considerando que la síntesis de VEGF fue restringida por el Compuesto 1 y la formación de tubos de células endoteliales es una etapa clave a lo largo del proceso angiogénico, se llevó a cabo un ensayo de formación de tubo capilar para probar el efecto antiangiogénico del estigmastano en un sistema celular. La condición de ensayo Matrigel apoya la diferenciación de HUVEC no tratadas en una red extensa y completa de estructuras similares a capilares (figura 5). La red capilar similar a tubos estaba ligeramente inhibida a las dosis más bajas del Compuesto 1, dado que 2,5 y 5  $\mu\text{M}$  redujeron la formación de tubos en 17,3% y 25,9% con respecto al control no tratado (figuras 5A, B y C).

Si bien estos valores no fueron estadísticamente significativos, el tratamiento con dosis más altas del Compuesto 1 (10  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$ ) evidenció fragmentos de tubos no conectados, lo que llevó a una reducción de 59,8% y 90,7% de la red en forma de tubo ( $p < 0,01$ ), respectivamente (figuras 5D y E). En este sentido, se obtuvo un perfil de respuesta a la dosis, ya que 40  $\mu\text{M}$  del estigmastano inhibieron en 93,9% la formación de tubos ( $p < 0,001$ ), mientras que se observó una inhibición completa con 50 y 100  $\mu\text{M}$  (figuras 5F, G y H).

Dado que la invasión de células endoteliales es un suceso crítico e inicial en la angiogénesis, se evaluó la capacidad de las HUVEC para migrar a través de una membrana porosa. Veinticuatro horas después de la siembra de células, se contó el número de células invasoras y se descubrió que 100 ng/ml de IL-6 mejoraron de manera significativa la invasión celular a través de la membrana de filtro en 155% ( $p < 0,001$ ). El Compuesto 1 suprimió la invasión de HUVEC de manera eficaz a través del filtro de una manera dependiente de la concentración debido a que se logró un 67,5%, 26,1% y 18,4% de inhibición a 40  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente, ( $p < 0,001$ ).

### 25 **Discusión**

Muchas infecciones víricas dan lugar a enfermedades inmunitarias clínicamente relevantes. El tratamiento de estas inmunopatologías se hace por lo general a través de la administración al paciente de inmunosupresores tales como corticosteroides. Sin embargo, estos tratamientos pueden dar lugar a la prolongación de la enfermedad debido a la reactivación del virus que persiste en las células hospedadoras, como en el caso de la HSK.

La HSK es una inmunopatología de origen vírico en el que las lesiones observadas en el ojo no son provocadas por la replicación vírica *per se*, sino como consecuencia de la respuesta inflamatoria desencadenada por la replicación vírica. Las lesiones oculares se hacen evidentes cuando el virus ya no es detectable en el ojo. Guess *et al.* (2007) discute la necesidad de la administración de un antivírico como ACV junto con corticosteroides, para el tratamiento de HSK en los seres humanos, así como también para mitigar la posible reactivación vírica debido a la inmunosupresión provocada por fármacos antiinflamatorios.

Sin embargo, la disponibilidad de los fármacos antiherpéticos es escasa, y el uso de fármacos antivíricos utilizados comúnmente contra HSV-1 está limitado por la aparición de mutantes víricos resistentes a estos fármacos. Este hecho, junto con la ausencia de una vacuna profiláctica para el HSV-1, plantea la necesidad de buscar nuevos fármacos eficaces contra este virus.

A partir de estos resultados sobre el efecto del Compuesto 1 en los ojos de ratones infectados por HSV-1, el hecho que atrae más la atención es que, incluso en ausencia de un efecto antivírico del estigmastano en las condiciones experimentales mencionadas anteriormente, se logra reducir de manera significativa los síntomas de la enfermedad que se desarrollan a continuación en las córneas. Dado que el efecto de curación del compuesto no se debe a una acción antivírica directa y se observa varios días después del final del tratamiento, es probable que la mejora de HSK observada esté relacionada con una actividad moduladora del Compuesto 1 sobre la respuesta inmunitaria innata una vez que se establece la infección. La infección por HSV-1 induce la activación de NF- $\kappa$ B y la secreción de citocinas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$  e IL-6. La activación de NF- $\kappa$ B se produce en dos fases: la primera, rápida y transitoria, podría ser inducida por la interacción de gD vírica con los receptores HVEA en la célula hospedadora y, por lo tanto, sería independiente de la replicación vírica; una segunda fase de activación, sostenida en el tiempo, requiere la replicación vírica activa y la síntesis de proteínas víricas.

El Compuesto 1 se añadió a las células después de la infección por HSV-1, que no estaba presente durante el estallido de la primera ola de la activación de NF- $\kappa$ B. El Compuesto 1 bloqueó la activación de NF- $\kappa$ B en 24 h p.i., lo que inhibe la segunda fase de la activación de NF- $\kappa$ B. Esta sería la consecuencia de su actividad inhibidora sobre la replicación *in vitro* de HSV-1. El compuesto no inhibió la translocación de NF- $\kappa$ B, pero redujo la replicación vírica y así, el número de células infectadas en las que se había producido la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B.

Durante la infección por HSV-1, el aumento de los niveles de IL-6 en el ojo favorece la llegada de células inflamatorias, tales como neutrófilos y macrófagos, responsables de la eliminación del virus de la córnea.

Las células epiteliales infectadas tratadas con el Compuesto 1 no sufrieron una reducción en los niveles de IL-6 a diferencia de DEX que, debido a su acción inmunosupresora conocida, produjo una inhibición significativa de esta secreción de citocinas en las células infectadas (figuras 2B y C). El efecto del Compuesto 1 sobre la producción de IL-6 parece ser contradictoria con su efecto inhibitorio sobre la translocación de NF- $\kappa$ B (figuras 1B y E). Sin embargo, la hipótesis de que este efecto fue el resultado de un equilibrio entre la actividad inhibitoria del estigmastano sobre la activación de NF- $\kappa$ B y un efecto inhibidor sobre la acción de desestabilización ejercida por proteínas víricas ICP4 e ICP27 en citocinas de codificación de ARNm, una consecuencia de su actividad antivírica *in vitro*.

Los altos niveles de citocinas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 en células HCLE y IOBA-NHC infectadas y tratadas con el estigmastano es una característica diferencial con respecto a DEX, que indujo una reducción en los niveles de estas citocinas en ambas estirpes celulares (figura 2).

Por lo tanto, si bien el Compuesto 1 no había mostrado ninguna actividad antivírica *in vivo*, podría estar ejerciendo un efecto modulador sobre la expresión de mediadores inflamatorios inducidos por el virus en las células infectadas o células no infectadas próximas a las infectadas, lo que podría explicar las diferencias descubiertas entre los ojos de los animales tratados con el estigmastano y los tratados con DEX durante los primeros días p.i., cuando el virus no se había eliminado por completo.

Por otro lado, el Compuesto 1 contuvo la producción de citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 en los macrófagos inducidos por LPS (figura 3G). Por lo tanto, la capacidad de estas células para eliminar el virus de los ojos de los ratones infectados por HSV-1 estaría restringida por el Compuesto 1 que, a su vez, daría cuenta de una potencia reducida de estas células para provocar daños a las córneas infectadas.

Estos resultados sugieren fuertemente que el Compuesto 1 ejercería una acción inmunosupresora en células inflamatorias que participan en la respuesta inmunitaria innata que aparece durante HSK, de la misma manera que lo hace DEX, pero el estigmastano tendría un efecto diferente en las células epiteliales infectadas (figuras 2 y 3).

Se probó que el Compuesto 1 disminuye la expresión de VEGF cuando es inducido por dos estímulos diferentes, LPS e IL-6, dando lugar no sólo a la formación de tubo en las células endoteliales, sino también a la migración de estas células, dos eventos principales durante la angiogénesis (figuras 4 y 5). Esta propiedad da una ventaja al Compuesto 1 sobre otros compuestos de la especie, dado que algunas otras moléculas sintéticas que pertenecen a la familia del Compuesto 1, con actividad antivírica e inmunomoduladora *in vitro*, no tienen una actividad antiangiogénica en el ensayo de formación de tubo en células HUVEC.

De este modo, el Compuesto 1 demostró ejercer un efecto antiangiogénico (además de las propiedades antivíricas e inmunomoduladoras descritas anteriormente) y, por lo tanto, la curación de HSK murino también sería debido a una acción antiangiogénica del Compuesto 1 contra el proceso de neovascularización de la córnea durante la enfermedad ocular inducida por HSV-1. Este novedoso efecto del Compuesto 1 no se comparte con otros compuestos que pertenecen a la misma familia de análogos sintéticos con propiedades antivíricas e inmunomoduladoras. Por lo tanto, se puede concluir que el efecto antiangiogénico del Compuesto 1 no es una consecuencia de su actividad inmunomoduladora.

En resumen, el estigmastano sintético diseñado como el Compuesto 1 sería un compuesto prometedor no sólo para curar una inmunopatología de origen vírico como HSK, sino también para mejorar otras enfermedades en las que la angiogénesis es el factor patógeno principal como en el caso de un tumor sólido.

#### Método de obtención del Compuesto 2: (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmasta-1,4-dien-3-ona

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

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

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 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)

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 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  $\text{cm}^{-1}$

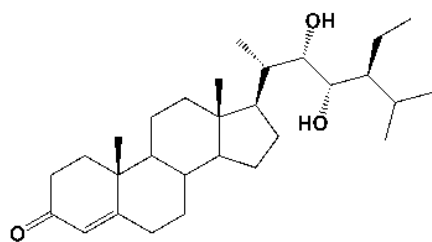
Evaluación de la actividad antiangiogénica del Compuesto 1 y el Compuesto 2, y otros brasinoesteroides (Compuesto III y Compuesto IV)

5 Se llevó a cabo un ensayo de formación de tubo capilar para evaluar un posible efecto antiangiogénico del Compuesto 2, en comparación con otros brasinoesteroides.

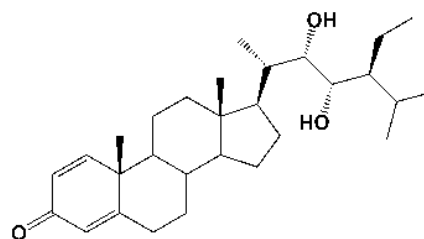
El Compuesto 2 comprende el compuesto (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmasta-1,4-dien-3-ona que se obtiene por medio de la reducción del Compuesto 1 y la introducción de un doble enlace  $\Delta^1$ .

10 Los compuestos III y IV presentan una estructura similar al Compuesto 1 y el Compuesto 2, respectivamente, con la adición de un átomo de flúor (F) en la posición 6 de la estructura esteroide.

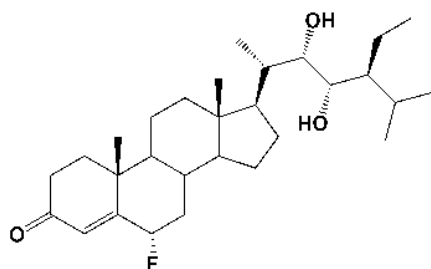
Las fórmulas estructurales de los compuestos estudiados 1, 2, III y IV son las siguientes:



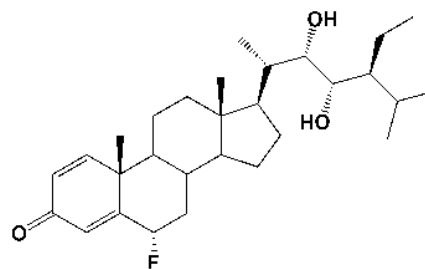
Compuesto I



Compuesto II



Compuesto III



Compuesto IV

20 Los cuatro compuestos pudieron inhibir la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos estimulados con LPS, es decir, todos exhiben una actividad inmunomoduladora.

La formación de estructuras similares a tubos capilares por las células HUVEC fue analizada en placas de cultivo celular de 24 pocillos recubiertas con una matriz de membrana extracelular (Matrigel; BD Biosciences). Matrigel se descongeló a 4°C. Utilizando placas y puntas preenfriadas, se distribuyeron 100  $\mu$ l/pocillo de Matrigel y se dejó gelificar a 37°C durante por lo menos 30 min. Las células se sembraron en el Matrigel polimerizado (5 a 8 x 10<sup>4</sup> células/pocillo) en ausencia y en presencia de concentraciones de 20  $\mu$ M y 40  $\mu$ M de cada compuesto. La placa se incubó a 37°C, y se observó la formación de tubo en un microscopio óptico invertido. El Compuesto 1 se utilizó como un control positivo.

35 Los Compuestos 1, 2, III y IV pertenecen a la familia de compuestos comprendidos por la patente internacional y nacional P070103089 PCT/IB2008/052703.

El Compuesto 2 (al igual que el Compuesto 1 en ensayos anteriores) mostró una actividad inhibitoria de estructuras similares a tubos capilares en ambas concentraciones evaluadas. Por el contrario, en presencia de los compuestos III y IV, las células HUVEC desarrollan la formación de estructuras similares a tubos capilares de la misma manera que las células de control sin tratamiento.

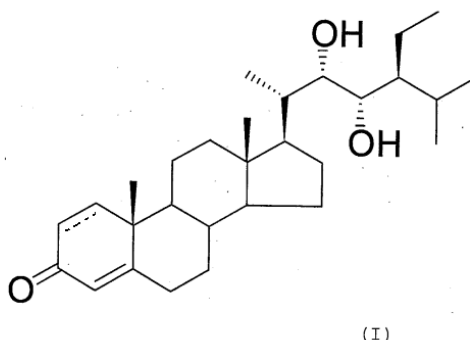
45 A pesar de que los compuestos III y IV tienen características estructurales y una capacidad inmunomoduladora similar a los compuestos 1 y 2, la actividad antiangiogénica no está presente en los compuestos III y IV.

Composiciones de brasinoesteroides de la fórmula general (I):


Una forma de realización de la invención es una formulación para el tratamiento de un tumor sólido seleccionado de entre el grupo que consiste en un carcinoma de mama, un carcinoma de pulmón, un carcinoma de próstata,



un carcinoma de colon, un carcinoma de ovario, un neuroblastoma, un tumor del sistema nervioso central, un glioblastoma multiforme y un melanoma comprende (a) brasinoesteroides de la fórmula general (I)



5

en la que  puede ser un enlace sencillo o doble y las configuraciones de los átomos de carbono C22 y C23, respectivamente unidos a los sustituyentes HO son S para ambos átomos de carbono, y un aditivo farmacéuticamente aceptable, que es un componente del aditivo farmacéuticamente aceptable seleccionado de un vehículo, un aglutinante, un estabilizador, un adyuvante, un diluyente, un excipiente, un tensioactivo, un odorante, o un colorante.

10

Otra forma de realización de la invención es una formulación para su utilización en el tratamiento de un tumor sólido seleccionado de entre el grupo que consiste en un carcinoma de mama, un carcinoma de pulmón, un carcinoma de próstata, un carcinoma de colon, un neuroblastoma, un tumor del sistema nervioso central, un glioblastoma multiforme y un melanoma que comprende (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmasta-4-en-3-ona (Compuesto 1) y un aditivo farmacéuticamente aceptable, el aditivo farmacéuticamente aceptable puede ser un componente seleccionado de un vehículo, un aglutinante, un estabilizador, un adyuvante, un diluyente, un excipiente, un tensioactivo, un odorante, o un colorante. Otra forma de realización de la invención es una formulación para su utilización en el tratamiento de un tumor sólido seleccionado de entre el grupo que consiste en un carcinoma de mama, un carcinoma de pulmón, un carcinoma de próstata, un carcinoma de colon, un carcinoma de ovario, un neuroblastoma, un tumor del sistema nervioso central, un glioblastoma multiforme y un melanoma que comprende (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmasta-1,4-dien-3-ona (Compuesto 2), y un aditivo, el aditivo es un componente seleccionado del entre un vehículo, un aglutinante, un estabilizador, un adyuvante, un diluyente, un excipiente, un tensioactivo, un odorante, o un colorante. Una formulación de acuerdo con la invención puede comprender además un segundo agente farmacéuticamente activo seleccionado de agentes antivírico antifúngico, antibacteriano, antiséptico, antiinflamatorio, inmunomodulador, antineoplásico, antiangiogénico y analgésico.

15

20

25

30

En dicha formulación, el agente antiangiogénico se selecciona de entre el grupo que consiste en vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel, docetaxel, 5 FU, cisplatino, carboplatino, irinotecán, topotecán y ciclofosfamida.

35

40

45

La composición de acuerdo con la invención, que comprende brasinoesteroides de la fórmula general (I) como componente activo, en una forma de realización preferida, para su utilización a través de administración oral, por ejemplo, como comprimidos o pastillas o cápsulas, en suspensiones o emulsiones, o en soluciones, en polvos o gránulos, o en jarabes o elixires. Las composiciones destinadas a la utilización oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados de entre el grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes con el fin de proporcionar preparaciones farmacéuticamente aceptables. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden estar recubiertos por medio de técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción. Una composición que comprende un brasinoesteroide de la fórmula general (I) se puede utilizar como un aditivo alimentario. Una baja toxicidad de brasinoesteroides permite utilizar dosis terapéuticas con una seguridad suficientemente alta. Por ejemplo, las dosis orales diarias, para un sujeto adulto, pueden comprender de aproximadamente 10 ug a aproximadamente 1000 mg de brasinoesteroide de la fórmula general (I).

50

En una composición de acuerdo con la invención, los brasinoesteroides de la fórmula general (I), pueden estar destinados a su utilización a través de la administración oral o parenteral. Por ejemplo, una composición que comprende brasinoesteroides de la fórmula general (I) se puede administrar por vía intramuscular, intraperitoneal, o intravenosa. En una forma de realización, la formulación activa puede ser para su utilización a través de la inserción en el cuerpo de un sujeto en necesidad del tratamiento por inyección subcutánea. En otra forma de realización, la formulación activa puede ser para su utilización a través de un depósito o un implante

insertado en el cuerpo, para proporcionar una liberación lenta de los brasinoesteroides de la fórmula general (I) en el cuerpo. Los brasinoesteroides (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona (Compuesto 1) y (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmasta-1,4-dien-3-ona (Compuesto 2) se formularon como la suspensión siguiente:

5	Compuesto 1 o 2:	1 mg
	Sulfato de sodio	36,0 mg
	Cloruro de Sodio	9,0 mg
	EDTA	0,3 mg
	Hidroxietilcelulosa	10,0 mg
10	Tiloxapol	1,5 mg
	Agua destilada	3 ml

La composición farmacéutica resultante se puede utilizar por vía parenteral.

### 15 Evaluación del efecto del Compuesto 1 sobre la respuesta angiogénica de la estirpe celular LMM3 de tumor de mama murino en ratones BALB/C.

#### Introducción

20 La angiogénesis tumoral es un proceso fundamental que comprende la formación de nuevos vasos sanguíneos que facilita la ingesta de oxígeno y nutrientes por el tumor que promueven su crecimiento y metástasis.

Anterior al ensayo *in vivo*, se evaluó el efecto citotóxico potencial del Compuesto 1 a diferentes concentraciones sobre la estirpe celular LMM3 de tumor de mama y la estirpe celular normal NMuNG. Esta medida asegura que el Compuesto 1, en las concentraciones utilizadas en el ensayo *in vivo*, están actuando sobre el proceso angiogénico, que es anterior al crecimiento de la masa tumoral y que no tiene ningún efecto sobre las células normales del mismo linaje. El efecto citotóxico del Compuesto 1 se evaluó como una curva de dosis-respuesta y se evaluó cada concentración en 2 momentos diferentes. A partir de este ensayo, se seleccionó la concentración efectiva del Compuesto 1 para ser utilizado en el ensayo *in vivo*. Dicha concentración fue de 0,025 µg/µL.

30

#### Alcance

Evaluar la capacidad del Compuesto 1 para ejercer un efecto antiangiogénico en un modelo de neovascularización *in vivo*.

35

#### Métodos

Para el ensayo *in vivo*,  $2 \times 10^6$  células/ml se cultivaron en 1 ml de medio completo en placas de 6 pocillos. El Compuesto 1 se incubó con células LMM3 durante 1 h y 6 h. Además, un grupo de células tumorales no tratadas se cultivaron y se incubaron. A continuación, todas las células de cada grupo se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se volvieron a suspender en 0,9 ml de medio F12 sin FBS.

40

Los ratones BALB/c hembras se asignaron al azar de acuerdo con lo presentado a continuación:

45

- Sham N = 4
- LMM3 N = 4
- LMM3 + Compuesto 1 - 1 hora de tratamiento N = 4
- LMM3 + Compuesto 1 - 6 horas de tratamiento N = 4

50 Entonces, la inoculación de  $2 \times 10^5$  células/0,1 ml se hizo por vía intradérmica en los flancos de ratones. Después de 5 días los animales fueron sacrificados y se tomaron fotografías del sitio de inoculación.

La densidad de vasos se cuantificó en cada animal y los resultados se analizaron por ANOVA seguido por la prueba de Tukey. Los resultados se expresaron como la media de la densidad de vasos (vasos/mm<sup>2</sup> +/- ES).

55

#### Resultados

En la figura 6 se puede observar que, de acuerdo con lo descrito anteriormente (Davel LE, 2004; Bueno CA, 2012), la inoculación de células LMM3 aumenta la respuesta neovascular en el sitio de inyección en comparación con el grupo "Sham" (control inoculado con vehículo solamente). La preincubación de las células con el Compuesto 1 0,025 µg/µL durante 1 h y 6 h redujo de manera significativa la respuesta angiogénica inducida por las células LMM3, lo cual disminuyó la densidad cuantificada de los vasos a valores similares a los mostrados por el grupo "Sham".

60

65 Los resultados obtenidos con el Compuesto 1 en el ensayo descrito muestran el efecto antiangiogénico del compuesto sobre la estirpe celular tumoral LMM3 e indican que presenta la capacidad de reducir de manera

significativa la angiogénesis tumoral en ratones BALB/c.

#### Bibliografía

5 Davel LE, Rimmaudo L, Español A, de la Torre E, Jasnis MA, Ribeiro ML, Gotoh T, de Lustig ES, Sales ME. Different mechanisms lead to the angiogenic process induced by three adenocarcinoma cell lines. *Angiogenesis*. 2004; 7(1):45 a 51.

10 Bueno CA, Lombardi MG, Sales ME, Alché LE. A natural antiviral and immunomodulatory compound with antiangiogenic properties. *Microvasc. Res*. 2012 Nov.; 84(3):235 a 241.

#### Conclusión final

15 Además de su capacidad de modular la respuesta inmunitaria a los estímulos víricos y no víricos, el Compuesto 1 se comporta como un fármaco antiangiogénico. *In vitro*, se demostró que disminuye la expresión de VEGF cuando es inducido por dos estímulos diferentes, LPS e IL-6, e impidió de manera significativa no sólo la formación similar a tubos en las células endoteliales, sino también la migración de estas células, dos eventos importantes que se producen durante la angiogénesis (ver las figuras 4 y 5). *In vivo*, el Compuesto 1 también reduce de manera significativa la angiogénesis tumoral en ratones BALB/c.

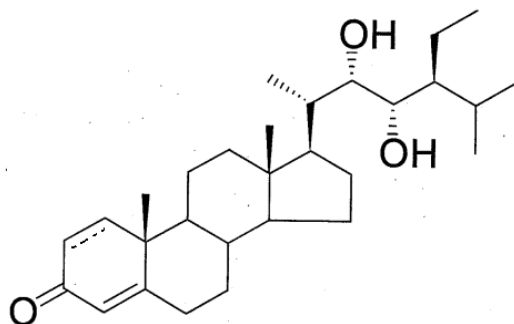
20 El efecto antiangiogénico descrito coloca al Compuesto 1 en ventaja sobre otros compuestos de la misma familia de análogos sintéticos, dado que algunos de ellos, con actividades antivíricas e inmunomoduladoras *in vitro*, no presentan una actividad antiangiogénica en el ensayo de formación de tubo en células HUVEC. Por lo tanto, la actividad antiangiogénica del Compuesto 1 mostrada *in vitro* e *in vivo* no es una consecuencia de sus propiedades inmunomoduladoras. La actividad antiangiogénica nueva del Compuesto 1 estaría asociada con la falta de la neovascularización en la córnea de los ratones durante la enfermedad ocular inducida por HSV-1.

25 En resumen, el estigmastano sintético diseñado como el Compuesto 1 sería un compuesto prometedor no sólo para curar una inmunopatología de origen vírico como HSK, sino también para mejorar otras enfermedades en las que la angiogénesis es el factor patogénico principal como, es decir, para inhibir la angiogénesis en un mamífero que presenta un tumor sólido seleccionado de entre el grupo que consiste en un carcinoma de mama, un carcinoma de pulmón, un carcinoma de próstata, un carcinoma de colon, un carcinoma de ovario, un neuroblastoma, un tumor del sistema nervioso central, un glioblastoma multiforme y un melanoma.

35


## REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende brasinoesteroides de la fórmula general (I)



(I)

5

en la que  puede ser un enlace sencillo o doble y las configuraciones de los átomos de carbono C22 y C23 unidos respectivamente a los sustituyentes HO son S para ambos átomos de carbono y un aditivo farmacéuticamente aceptable para su utilización en el tratamiento de un tumor sólido en un mamífero inhibiendo la angiogénesis, en la que el tumor se selecciona de entre el grupo que consiste en carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma de próstata, carcinoma de colon, carcinoma de ovario, neuroblastoma, tumor del sistema nervioso central, glioblastoma multiforme y melanoma.

10

2. Composición para su utilización en el tratamiento de un tumor sólido en un mamífero inhibiendo la angiogénesis según la reivindicación 1, en la que la composición de brasinoesteroide de la fórmula general (I) comprende un brasinoesteroide seleccionado de entre: (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmast-4-en-3-ona y (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmasta-1,4-dien-3-ona y un aditivo farmacéuticamente aceptable.

15

3. Composición para su utilización en el tratamiento de un tumor sólido en un mamífero inhibiendo la angiogénesis según la reivindicación 1 o 2, en la que el aditivo farmacéuticamente aceptable se selecciona de entre vehículo, aglutinante, estabilizador, adyuvante, diluyente, excipiente, tensioactivo, odorante, o colorante.

20

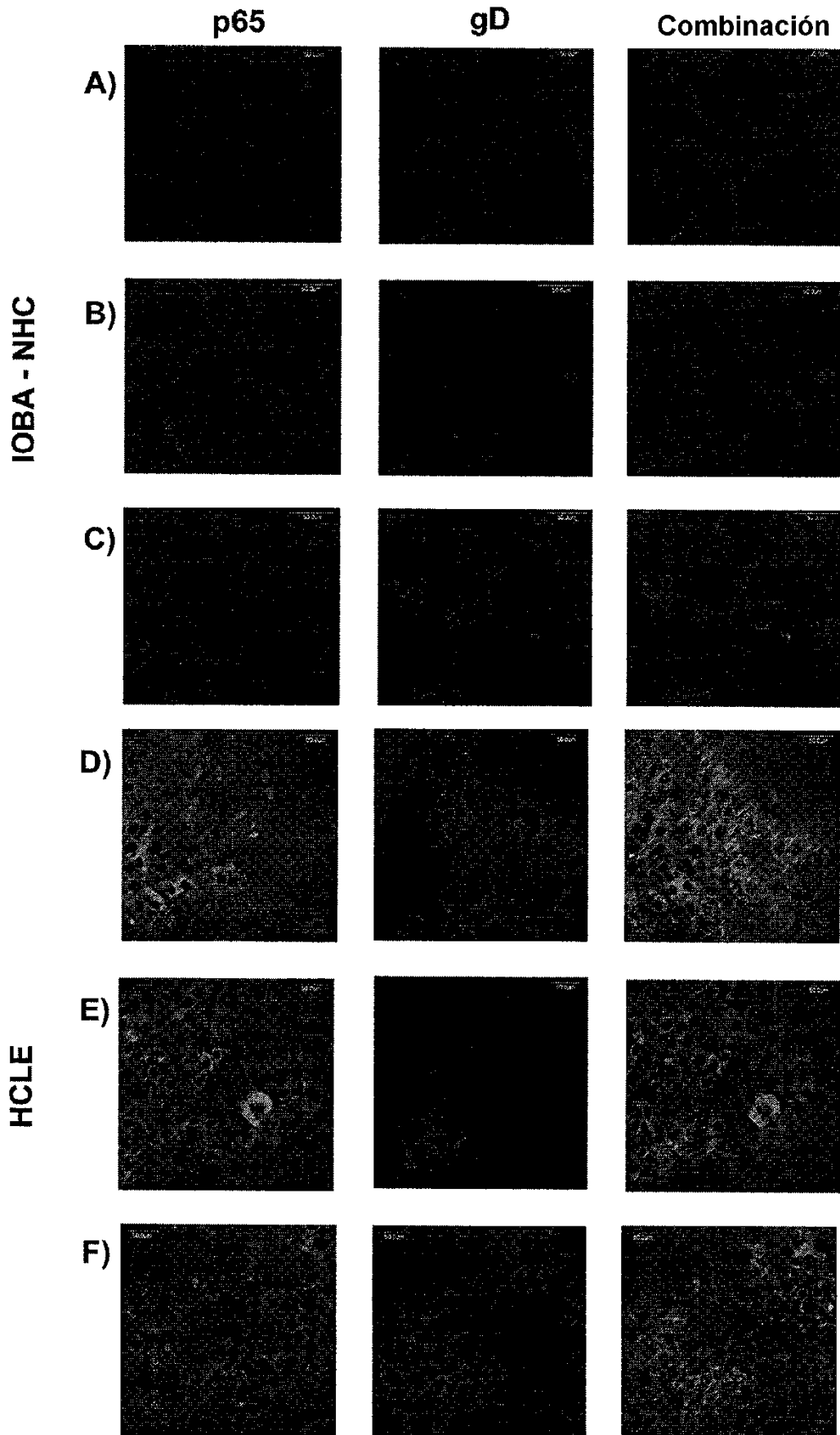
4. Composición para su utilización en el tratamiento de un tumor sólido en un mamífero inhibiendo la angiogénesis según la reivindicación 3, en la que la composición comprende además un segundo agente activo farmacéuticamente seleccionado de entre antivírico, antifúngico, antibacteriano, antiséptico, antiinflamatorio o inmunomodulador, antineoplásico, antiangiogénico y analgésico.

25

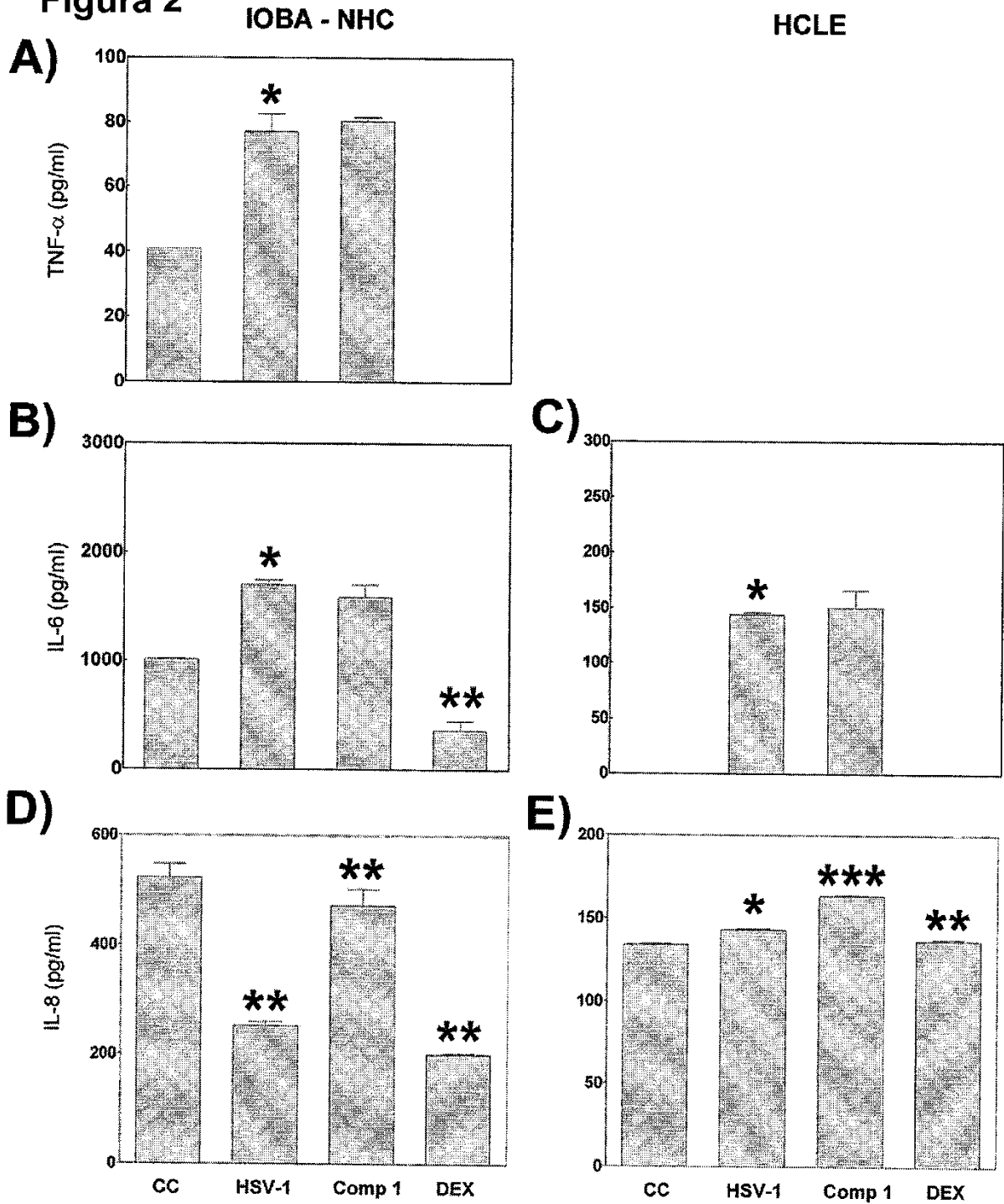
5. Composición para su utilización en el tratamiento de un tumor sólido en un mamífero inhibiendo la angiogénesis según la reivindicación 4, en la que el agente antiangiogénico se selecciona de entre el grupo que consiste en vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel, docetaxel, 5 FU, cisplatino, carboplatino, irinotecán, topotecán y ciclofosfamida.

30

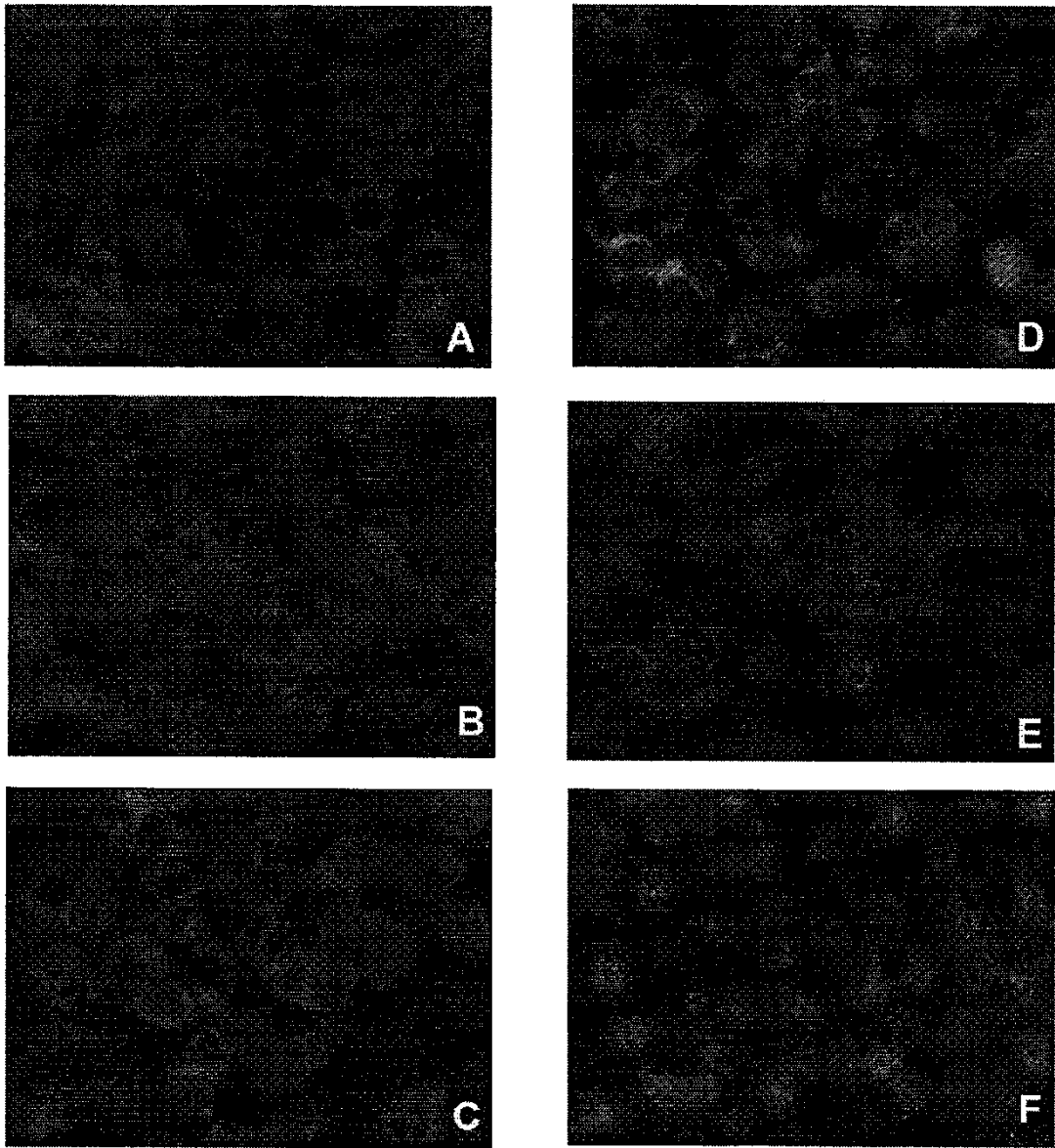
Figura 1



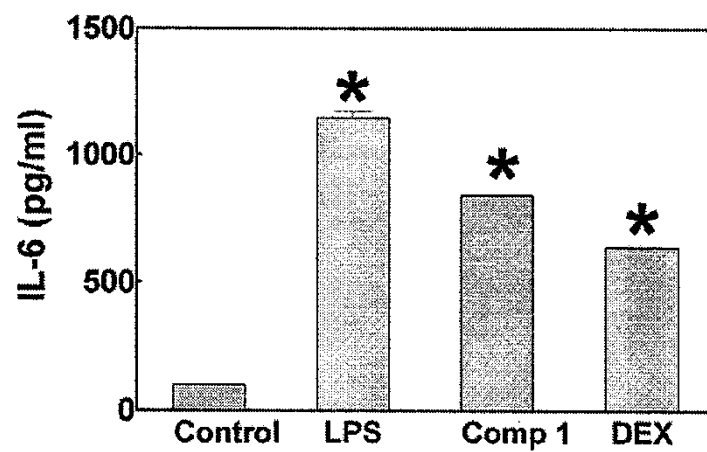
**Figura 2**



**Figura 3**



**G)**



# Figura 4

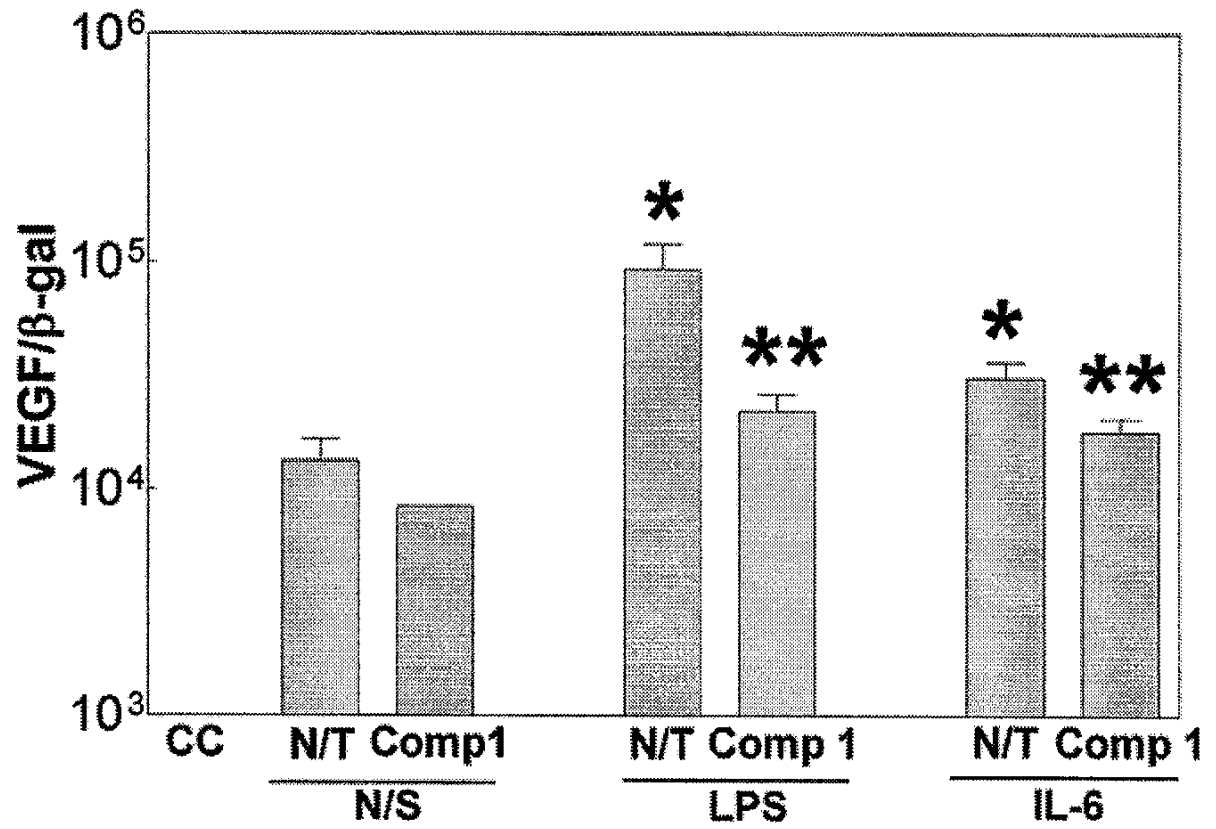




Figura 5

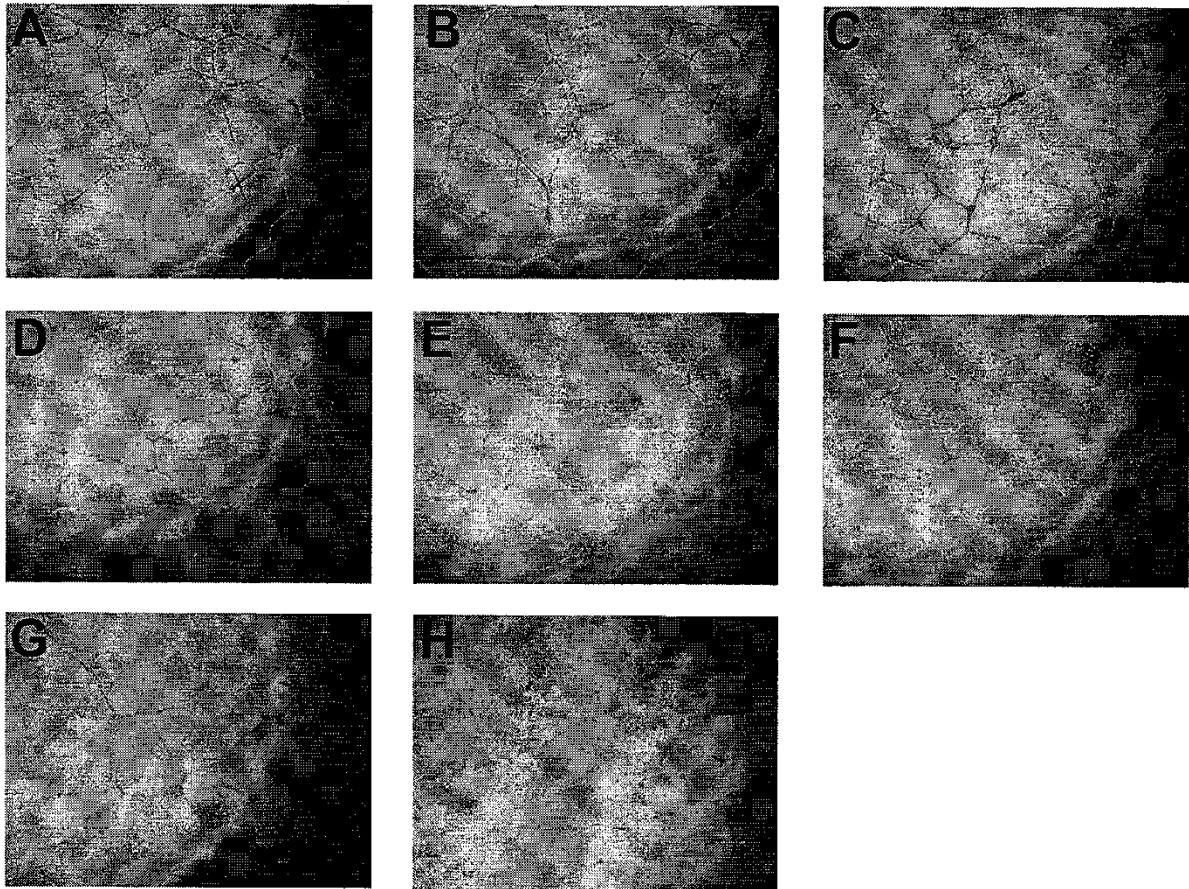
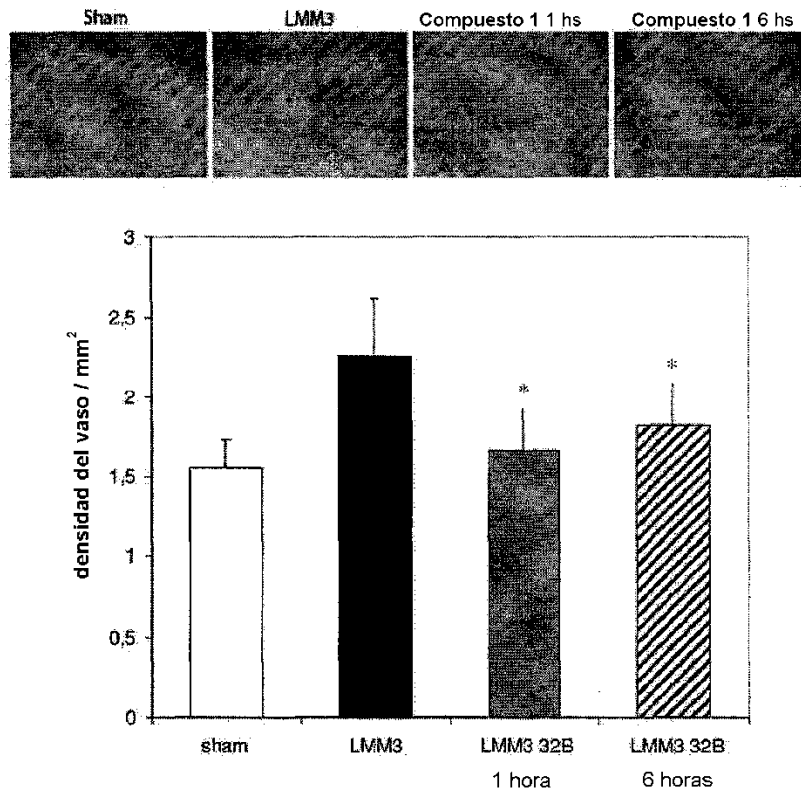


Figura 6



Efecto anti-angiogénico del Compuesto 1 en la respuesta neovascular in vivo inducida por células LMM3 en ratones BALB/c. Se inocularon  $2 \times 10^5$  células/0,1 ml al costado de cada ratón BALB/c. Cinco días después de la inoculación los animales fueron sacrificados y se tomaron fotografías del sitio de la inoculación. El panel superior muestra imágenes representativas de cada grupo experimental. En el gráfico, se muestra la densidad del vaso (vasos/mm<sup>2</sup>) de acuerdo con lo cuantificado para cada grupo +/- ES \*  $p < 0,001$  vs LMM3.

Tabla 1

Número de acceso	Gen	Nombre del gen	valor $p^b$	cambio de pliegue <sup>c</sup>
<b>a) Genes expresados de manera diferencial en células de HCLE infectadas con HSV-1 y tratadas con el compuesto 1</b>				
<b>Sobreexpresados</b>				
NM_000584	IL-8	<i>interleucina 8</i>	0,000152	4,4
NM_000575	IL-1 $\alpha$	<i>interleucina 1, alpha</i>	0,000157	2,9
NM_002089	CXCL2	<i>quimiocina (motivo C-X-C) ligando 2</i>	0,000647	2,9
NM_016232	IL-1RL1	<i>interleucina 1 similar a receptor 1</i>	0,001224	5,2
NM_000758	CSF(GM-CSF)	<i>Factor estimulante de colonia 2 (granulocitos y macrófagos)</i>	0,001908	2,2
<b>b) Genes expresados de manera diferencial en células J774A.1 activadas con LPS y tratadas con el compuesto 1</b>				
<b>Reprimidos</b>				
NM_008361	IIIb	<i>interleucina 1 beta</i>	0,0000379	2,58
NM_010090	Dusp2	<i>Fosfatasa de especificidad dual</i>	0,000304884	3,86
<b>Sobreexpresados</b>				
NM_007778	Csfl	<i>Factor estimulante de colonia 1 (macrófago)</i>	0,0000844	4,42
NM_007498	Atf3	<i>Factor de transcripción de activación 3</i>	0,000133	4,41
NM_021274	CXCL10	<i>quimiocina (motivo C-X-C) ligando 10</i>	0,000353	11,41
NM_008352	III2b	<i>interleucina 12 b</i>	0,009584472	4,19
NM_007706	Socs2	<i>Supresor de señalización de citocina 2</i>	0,042965613	2,29
NM_011414	Slpi	<i>Inhibidor de peptidasa leucocitaria secretora</i>	0,000149	1,53
NM_021297	TLR4	<i>Receptor de tipo toll</i>	0,002540414	1,95
NM_010548	IL-10	<i>interleucina 10</i>	0,003137306	1,27
NM_031168	IL-6	<i>interleucina 6</i>	0,004674967	1,97
NM_008330	Ifi47	<i>Proteína 10 inducible de interferón gamma</i>	0,004765124	2,49
NM_031252	I123a	<i>interleucina 13, subunidad alfa p19l</i>	0,004775975	3,19
NM_019494	CXCL11	<i>quimiocina (motivo C-X-C) ligando 11</i>	0,008359252	6,01

<sup>a</sup>Número de acceso en el GeneBank (NCBI). <sup>b</sup>Prueba t para muestras pareadas. <sup>c</sup>Control tratado de expresión relativa.