

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 779**

51 Int. Cl.:
C07D 498/18 (2006.01)
A61K 31/436 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
C07D 498/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05849447 .7**
96 Fecha de presentación: **15.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1828202**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54 Título: **Análogos de rapamicina y usos de los mismos en el tratamiento de trastornos neurológicos, proliferativos e inflamatorios**

30 Prioridad:
20.12.2004 US 637666 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.05.2012

73 Titular/es:
**WYETH LLC
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:
**GRAZIANI, Edmund, Idris;
PONG, Kevin y
SKOTNICKI, Jerauld**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 380 779 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

Análogos de rapamicina y usos de los mismos en el tratamiento de trastornos neurológicos, proliferativos e inflamatorios.

Antecedentes de la invención

5 La presente invención proporciona análogos de rapamicina y su uso en el tratamiento de trastornos neurológicos, proliferativos e inflamatorios.

La apoplejía isquémica, que explica el 83% de todos los casos de apoplejía (el 17% restante son los de tipo hemorrágico) aparece en aproximadamente 700,000 americanos cada año, que equivale a aproximadamente un caso de apoplejía cada 45 segundos. Las apoplejías sistémicas aparecen como resultado de una obstrucción en un vaso sanguíneo que suministra sangre al cerebro. La condición subyacente para este tipo de obstrucción es el desarrollo de depósitos grasos revistiendo los vasos sanguíneos, llamada aterosclerosis. Estos depósitos grasos pueden causar dos tipos de obstrucción: 1) trombosis cerebral, que se refiere a un trombo (coágulo de sangre) que se desarrolla en la parte atascada del vaso y 2) embolia cerebral, que se refiere generalmente a un coágulo de sangre que se forma en otra localización en el sistema circulatorio, normalmente el corazón y las arterias largas del tronco superior y cuello. Una parte del coágulo de sangre se desprende, entra en la corriente sanguínea y viaja a través de los vasos sanguíneos del cerebro hasta que alcanza vasos demasiado pequeños para poder pasar. Las terapias actuales para tratar la apoplejía isquémica son limitadas. Hasta la fecha, el único fármaco aprobado para la apoplejía isquémica es un activador recombinante del plasminógeno tisular (rt-PA). El activador recombinante del plasminógeno tisular (rt-PA), que actúa como un trombolítico, tiene una ventana terapéutica de oportunidad limitada (tres horas), permitiendo por lo tanto que sólo el 1-2% de todos los pacientes que apoplejía reciban tratamiento. No existen en el mercado agentes neuro protectores para la apoplejía isquémica.

La enfermedad de Parkinson (PD) es una enfermedad neurodegenerativa que desde el punto de vista neuropatológico se caracteriza por la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) de la sustancia negra. La enfermedad de Parkinson (PD) es una enfermedad progresiva con una edad media de comienzo de 55 años, aunque el 15% de los pacientes se diagnostican antes de los 50 años. Se estima que 1,5 millones de americanos padecen la enfermedad de Parkinson. Algunos de los signos clásicos de la enfermedad de Parkinson son temblores en un lado del cuerpo, lentitud generalizada de movimientos (bradiquinesia), agarrotamiento de los miembros (rigidez) y problemas de equilibrio o en la forma de caminar (disfunción postural). Las medicaciones actuales para la enfermedad de Parkinson tratan los síntomas, mientras que ninguna previene o retarda la degeneración de las neuronas dopaminérgicas.

Dada su importancia clínica, las moléculas prototipo que exhiben claramente una actividad tanto neuroprotectora como neuroregeneradora son muy demandadas. Las neurotrofinas son una familia de proteínas que tienen unas propiedades terapéuticas extraordinarias en modelos de neurodegeneración preclínicos. Aunque experimentalmente prometedor, el desarrollo clínico de las neurotrofinas se encontró con obstáculos y retrasos serios, tales como la incapacidad de suministrar estas proteínas de gran tamaño a las poblaciones de neuronas objetivo, la inestabilidad de las proteínas, y la actividad no específica.

El documento de patente EP-A-0778023 analiza el uso de la rapamicina, el aducto 1,3 Diels Alder de la rapamicina con feniltriazolindiona, el 42-éster de rapamicina con ácido4-[[4-(dimetilamino)fenil]azo]-bencenosulfónico, el aducto 1,3 Diels Alder de la rapamicina con metiltriazolindiona, o la O-bencil-27-oxima de la rapamicina como agente neuroprotector.

El documento de patente EP-A-0475577 analiza los derivados hidrogenados de la rapamicina, en los que uno, dos o tres de los dobles enlaces en las posiciones 1, 3, o 5 de la rapamicina se han reducido a los correspondientes alcanos, que se mostraron útiles como agentes antifúngicos.

Li et al (J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 7487-7493) analizan el uso de la espectrometría de masas por nebulización iónica para obtener los espectros de masas del complejo rapamicina FKBP con ligando de inmunofilina.

Dickman et al (Bioorg. & Med. Chem. Lett. 2000, 10, 1405-1408) analizan determinados 1,2,3,4-tetrahidro y 7-N-hidroxicarbamato derivados de la rapamicina.

Lo que se necesita en la técnica son compuestos útiles adicionales para el tratamiento de los trastornos neurológicos, proliferativos, e inflamatorios.

50 Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona nuevos compuestos útiles para el tratamiento y para la preparación de medicamentos útiles en el tratamiento de trastornos neurológicos, proliferativos, e inflamatorios.

En otro aspecto, la presente invención proporciona nuevos agentes neuroprotectores, antiproliferativos y antiinflamatorios.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona nuevos compuestos útiles para el tratamiento y para la preparación de medicamentos útiles en el tratamiento de enfermedades neoplásicas benignas o malignas, carcinomas, y adenocarcinomas.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona nuevos compuestos útiles para el tratamiento y para la preparación de medicamentos útiles en el tratamiento de trastornos inflamatorios, que incluyen sin limitación, trastornos autoinmunes (por ejemplo, lupus), trastornos inflamatorios de la piel, trastornos inflamatorios intestinales, asma y trastornos atópicos, y rechazo al trasplante o injerto.

En aún otro aspecto adicional, la presente invención proporciona análogos de rapamicina y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para la preparación de análogos de rapamicina.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona compuestos para su uso en procedimientos de tratamiento de trastornos neurológicos, proliferativos, cardiovasculares e inflamatorios.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos para su uso en procedimientos de tratamiento de las complicaciones debidas a apoplejía o trauma craneal.

15 En aún otro aspecto adicional, la presente invención proporciona compuestos para su uso en procedimientos de tratamiento de enfermedades neoplásicas benignas o malignas, carcinomas, y adenocarcinomas.

20 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos para su uso en procedimientos para el tratamiento de trastornos inflamatorios, que incluyen sin limitación, trastornos autoinmunes (por ejemplo, lupus), trastornos inflamatorios de la piel, trastornos inflamatorios intestinales, asma y trastornos atópicos, y rechazo al trasplante o injerto.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una endoprótesis vascular o derivación que se ha recubierto o impregnado con un compuesto de la presente invención.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describen adicionalmente en las siguientes descripciones detalladas de las realizaciones preferentes de la misma.

25 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 proporciona el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) del compuesto del Ejemplo 1. El espectro RMN se obtuvo en d₃-acetónitrilo usando un espectrómetro de 400 MHz.

La Figura 2 proporciona el espectro RMN del compuesto del Ejemplo 2. El espectro RMN se obtuvo en d₃-acetónitrilo usando un espectrómetro de 400 MHz.

30 La Figura 3 proporciona el espectro RMN del compuesto del Ejemplo 3. El espectro RMN se obtuvo en d₃-acetónitrilo usando un espectrómetro de 400 MHz.

La Figura 4 proporciona el espectro RMN del compuesto del Ejemplo 4. El espectro RMN se obtuvo en d₃-acetónitrilo usando un espectrómetro de 400 MHz.

35 La Figura 5 proporciona el espectro RMN del compuesto del Ejemplo 5. El espectro RMN se obtuvo en d₃-acetónitrilo usando un espectrómetro de 400 MHz.

La Figura 6 proporciona el espectro RMN del compuesto del Ejemplo 6. El espectro RMN se obtuvo en d₃-acetónitrilo usando un espectrómetro de 400 MHz.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención proporciona nuevos análogos de rapamicina que son útiles como agentes neuroprotectores, antiproliferativos, y/o antiinflamatorios. Los nuevos análogos de rapamicina tienen sustituyentes heteroatómicos en las posiciones 1 y 4 del esqueleto de rapamicina. En otra realización, la presente invención proporciona análogos de rapamicina que tienen una estructura cíclica en las posiciones 1, 2, 3 y/o 4 del esqueleto de rapamicina.

45 Estos nuevos compuestos de la presente invención son útiles como agentes neuroprotectores en composiciones para su uso en el tratamiento de trastornos neurológicos. El trastorno neurológico, que incluye, por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa o degenerativa neuromuscular, puede ser el resultado de un trastorno genético presente al nacer, un trastorno desarrollado durante el período de vida de un individuo, *por ejemplo*, apoplejía, y/o el resultado de un trauma físico, *por ejemplo*, craneal, lesión espinal, o lesión en el sistema nervioso periférico.

50 De esta manera, un compuesto de la presente invención puede ser útil para el alivio de los síntomas de un trastorno neurológico preexistente y en la prevención de la neurodegeneración o degeneración neuromuscular asociadas. En ciertas realizaciones, los agentes neuroprotectores de la presente invención se pueden utilizar para retrasar la aparición de síntomas asociados con un trastorno neurológico.

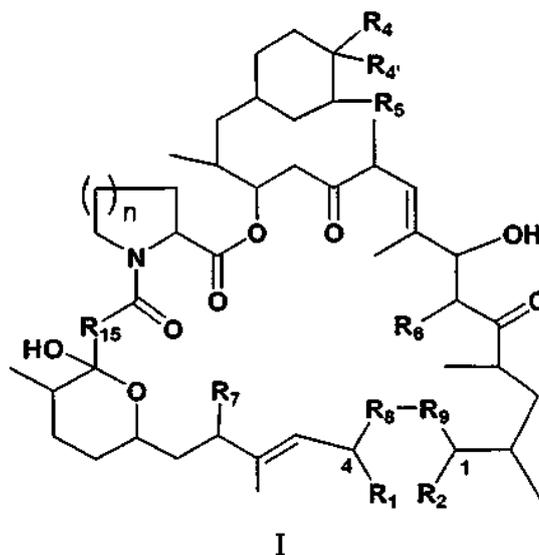
Los nuevos compuestos de la presente invención son también útiles como agentes antiproliferativos y antiinflamatorios y de esta manera son útiles en el tratamiento de trastornos inflamatorios, incluyendo trastornos

autoinmunes, trastornos artríticos, trastornos inflamatorios de la piel, trastornos inflamatorios intestinales, asma y trastornos atópicos, y rechazo al trasplante o injerto.

De forma sorprendente, se ha descubierto que al menos dos compuestos de la presente invención, *por ejemplo*, 9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-37-fenil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona y 37-(4-cloro-3-metilfenil)-9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; presentan actividad antiproliferativa e inmunosupresora.

I. Compuestos de la presente invención

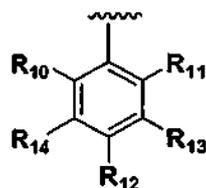
La presente invención proporciona análogos de rapamicina de fórmula I:



En la fórmula indicada anteriormente, R₁ y R₂ son grupos diferentes e independientes y se seleccionan entre OR₃ y N(R_{3'})(R_{3''}) o R₁ y R₂ son diferentes y se conectan a través de un enlace sencillo, y se seleccionan entre O y NR₃. R₃, R_{3'}, y R_{3''} se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁ a C₆, alquilo C₁ a C₆ sustituido, cicloalquilo C₃ a C₈, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, y heteroarilo sustituido. R₄ y R_{4'} (a) se seleccionan independientemente entre H, OH, O(alquilo C₁ a C₆), O(alquilo C₁ a C₆ sustituido), O(acilo), O(arilo), O(arilo sustituido), y halógeno; o (b) se toman juntos para formar un doble enlace con O. R₅, R₆, y R₇ se seleccionan independientemente entre H, OH, y OCH₃. R₈ y R₉ se conectan a través de (i) un enlace sencillo y son CH₂ o (ii) un doble enlace y son CH. R₁₅ se selecciona entre C=O, CHOH, y CH₂ y n es 1 ó 2; o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En realizaciones adicionales, R₁ y R₂ se conectan a través de un enlace sencillo y se seleccionan entre O y NR₃. En otras realizaciones adicionales, R₁ es O y R₂ es NR₃.

En una realización, R₃, o R_{3'} es un arilo o un grupo arilo sustituido, o un anillo de benceno sustituido. En otra realización, los grupos de benceno sustituidos en R_{3'} o R_{3''} incluyen anillos de la siguiente estructura:

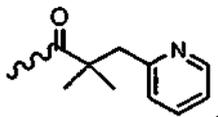


R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃, y R₁₄ se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁ a C₆, halógeno, acilo, OH, O(alquilo), O(arilo), O(acilo), NH₂, NH(alquilo).

En otras realizaciones, R₃, R_{3'} o R_{3''} son fenilo opcionalmente sustituido con 1 ó 2 sustituyentes seleccionados entre alquilo C₁ a C₆ y halógeno. En otras realizaciones adicionales, R₃, R_{3'} o R_{3''} son fenilo opcionalmente sustituido con 1

ó 2 sustituyentes metilo o cloro, por ejemplo fenilo y 3-metilo, 4-clorofenilo.

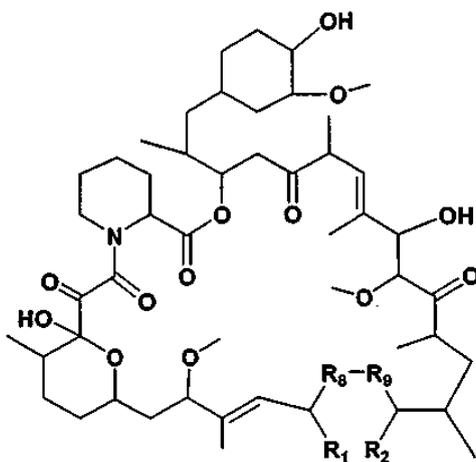
En una realización, R_4 o R_4' son OH u O(acilo), *por ejemplo*, en los que el acilo es -C(O)- alquilo opcionalmente sustituido, en los que en particular el alquilo puede ser lineal o ramificado y opcionalmente sustituido por ejemplo con heterociclos tales como heterociclos aromáticos tales como piridilo. Un ejemplo es:



5

En otras realizaciones, los análogos de rapamicina de fórmula I incluyen aquellos en los que R_5 , R_6 y R_7 son OCH_3 , aquellos en los que el anillo que contiene nitrógeno en las posiciones 17-22 del esqueleto de rapamicina es un anillo de piperidina, o en los que R_{15} es un carbonilo.

En una realización, la presente invención proporciona compuestos de la siguiente fórmula Ia:

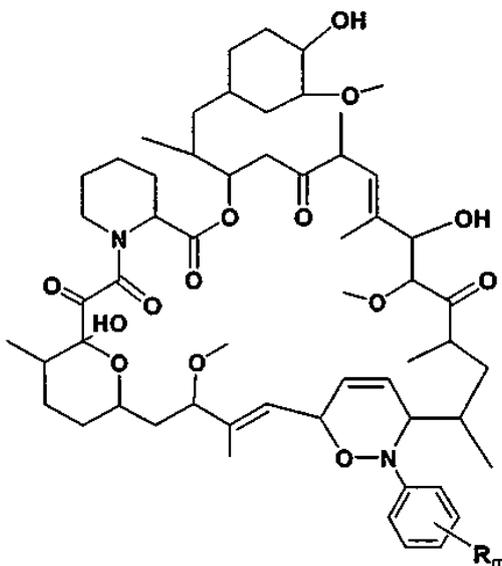


Ia

10

en la que R_1 , R_2 , R_8 , y R_9 se definen como se indicó anteriormente.

En otra realización, la invención proporciona compuestos de la siguiente fórmula Ib:



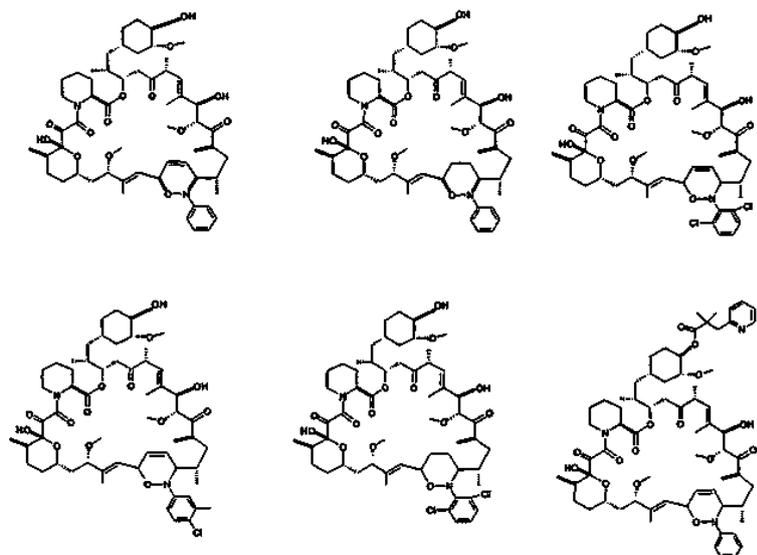
Ib

En la fórmula Ib, R se selecciona independientemente entre H, alquilo C_1 a C_6 , alquilo C_1 a C_6 sustituido, arilo, arilo

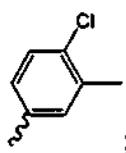
sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, halógeno, acilo, OH, O(alquilo), O(alquilo sustituido), O(arilo), O(arilo sustituido), O(acilo), NH₂, NH(alquilo), NH(alquilo sustituido), NH(arilo), NH(arilo sustituido), y NH(acilo) y m es 1 a 5.

En el presente documento se ilustran compuestos específicos de la presente invención e incluyen 9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-37-fenil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; 9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-37-fenil-4,9,10,12,13,14,15,16,17,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-heneicosahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; 37-(4-cloro-3-metilfenil)-9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; 37-(2,6-diclorofenil)-9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; éster de la 9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-37-fenil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona con ácido 2,2-dimetil-3-(piridin-2-il)-propiónico; 37-(2,6-diclorofenil)-9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; o metabolitos, profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. La presente invención no se limita a estos compuestos ilustrativos.

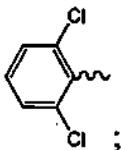
En otra realización, los compuestos específicos incluyen los siguientes:



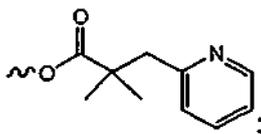
La presente invención también proporciona un compuesto en el que R₁ y R₂ se conectan a través de un enlace sencillo; R₁ es O; R₂ es NR₃; R₃ es fenilo; R₄ es OH; R₅-R₇ son OCH₃; y R₈ y R₉ son HC=CH; un compuesto en el que R₁ es OR₃; R₂ es N(R₃')(R₃''); R₃ es H; R₃' es H; R₃'' es fenilo; R₄ es OH; R₅-R₇ son OCH₃; y R₈ y R₉ son H₂C-CH₂; un compuesto en el que R₁ y R₂ se conectan a través de un enlace sencillo; R₁ es O; R₂ es NR₃; R₃ es fenilo; R₄ es OH; R₅-R₇ son OCH₃; y R₈ y R₉ son H₂C-CH₂; un compuesto en el que R₁ y R₂ se conectan a través de un enlace sencillo; R₁ es O; R₂ es NR₃; R₄ es OH; R₅-R₇ son OCH₃; R₈ y R₉ son HC=CH; y R₃ es



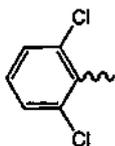
un compuesto en el que R_1 y R_2 se conectan a través de un enlace sencillo; R_1 es O; R_2 es NR_3 ; R_4 es OH; R_5 - R_7 son OCH_3 ; R_8 y R_9 son $HC=CH$; y R_3 es



5 un compuesto en el que R_1 y R_2 se conectan a través de un enlace sencillo; R_1 es O; R_2 es NR_3 ; R_3 es fenilo; R_5 - R_7 son OCH_3 ; R_8 y R_9 son $HC=CH$; y R_4 es



y un compuesto en el que R_1 y R_2 se conectan a través de un enlace sencillo; R_1 es O; R_2 es NR_3 ; R_4 es OH; R_5 - R_7 son OCH_3 ; R_8 y R_9 son H_2C-CH_2 ; y R_3 es



10 Los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricos y algunos de los compuestos pueden contener uno o más centros asimétricos (quirales) y de esta manera pueden dar lugar a isómeros ópticos y diastereómeros. Aunque se muestren sin tener en cuenta la estereoquímica, cuando los compuestos pueden contener uno o más centros quirales, preferentemente al menos uno de los centros quirales presenta la estereoquímica S. De esta manera, la presente invención incluye tales isómeros ópticos y diastereómeros; así como el racémico y los estereoisómeros enantioméricamente puros resueltos, así como otras mezclas de los estereoisómeros R y S, y los hidratos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

15 El término "alquilo" se usa en el presente documento para referirse a grupos hidrocarburos alifáticos saturados tanto de cadena sencilla como ramificada que contienen de 1 a 10 átomos de carbono, y de forma deseable aproximadamente de 1 a 8 átomos de carbono. El término "alquenilo" se usa en el presente documento para referirse a grupos alquilo tanto de cadena sencilla como ramificados que contienen uno o más enlaces dobles carbono carbono y que contienen aproximadamente de 2 a 10 átomos de carbono. En una realización, el término alquenilo se refiere a un grupo alquilo que contiene 1 o 2 enlaces dobles y que contiene de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. El término grupo "alquinilo" se usa en el presente documento para referirse a grupos alquilo tanto de cadena lineal como ramificados que contienen uno o más enlaces triples carbono carbono y que contienen de dos a ocho átomos de carbono. En otra realización, el término alquinilo se refiere a un grupo alquilo que contiene uno o dos enlaces triples carbono carbono y contiene de dos a seis átomos de carbono.

El término "cicloalquilo" se usa en el presente documento para referirse a grupo alquilo como se ha descrito anteriormente que tiene una estructura cíclica y contiene aproximadamente de 4 a 10 átomos de carbono, o aproximadamente de 5 a 8 átomos de carbono.

30 Los términos "alquilo sustituido", "alquenilo sustituido", y "alquinilo sustituido" se refieren a grupos alquilo, alquenilo, y alquinilo, respectivamente, que contienen uno o más sustituyentes que incluyen, pero sin limitación, halógeno, CN, OH, NO_2 , amino, arilo, heterocíclico, alcoxi, ariloxi, alquilcarbonilo, alquilcarboxi, y ariltio, cuyos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos por ejemplo con 1 a 4 sustituyentes que incluyen halógeno, CN, OH, NO_2 , amino, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, ariloxi, alquiloxi, alquilcarbonilo, alquilcarboxi, aminoalquilo, y ariltio. Estos sustituyentes se pueden unir a cualquier carbono de un grupo alquilo, alquenilo, o alquinilo siempre que la unión constituya un radical químico estable.

40 El término "arilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema aromático, por ejemplo, de 6-20 átomos de carbono, que puede incluir un anillo sencillo o anillos aromáticos múltiples condensados o unidos juntos (por ejemplo dos o tres) en los que al menos una parte de los anillos unidos o condensados forma el sistema aromático conjugado. Los grupos arilo pueden incluir, pero sin limitación, fenilo, naftilo, bifenilo, antrilo, tetrahidronaftilo, fenantrilo, indano, benzonaftilo, fluorenilo, y carbazolilo.

El término "arilo sustituido" se refiere a un grupo arilo que está sustituido con uno o más sustituyentes que consiste en halógeno, CN, OH, NO₂, amino, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, ariloxi, alquiloxi, alquilcarbonilo, alquilcarboxi, aminoalquilo, y ariltio, cuyos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos. En una realización, un grupo arilo sustituido está sustituido con 1 a 4 sustituyentes que incluyen halógeno, CN, OH, NO₂, amino, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, ariloxi, alquiloxi, alquilcarbonilo, alquilcarboxi, aminoalquilo, y ariltio.

El término "heterocíclico", como se usa en el presente documento, se refiere a anillos heterocíclicos estables multicíclicos o monocíclicos de 4 a 7 miembros que están saturados, parcialmente insaturados, o completamente insaturados, incluyendo anillos aromáticos tales como el piridilo. El anillo heterocíclico contiene átomos de carbono y uno o más heteroátomos que incluyen átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre. En una realización, el anillo heterocíclico contiene de 1 a 4 heteroátomos en el esqueleto del anillo. Cuando el anillo heterocíclico contiene átomos de nitrógeno o azufre en el esqueleto del anillo, los átomos de nitrógeno o azufre pueden estar oxidados. El término "heterocíclico" también se refiere a anillos multicíclicos, por ejemplo, de 9 a 20 miembros en el anillo en los que un anillo heterocíclico está condensado a un anillo arilo. El anillo heterocíclico se puede unir al anillo arilo a través de un heteroátomo o un átomo de carbono, siempre que la estructura del anillo heterocíclico resultante sea estable químicamente.

Se conocen una diversidad de grupos heterocíclicos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, anillos que contienen oxígeno, anillos que contienen nitrógeno, anillos que contienen azufre, anillos que contienen una mezcla de heteroátomos, anillos condensados que contienen heteroátomos, y combinaciones de los mismos. Los anillos que contienen oxígeno incluyen, pero no se limitan a, anillos de furilo, tetrahydrofuranilo, piranilo, pironilo, y dioxinilo. Los anillos que contienen nitrógeno incluyen, pero sin limitación, anillos de pirroloilo, pirazolilo, imidazolilo, triazolilo, piridilo, piperidinilo, 2-oxopiperidinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, piperazinilo, azepinilo, triazinilo, pirrolidinilo, y azepinilo. Los anillos que contienen azufre incluyen, pero sin limitación, anillos de tienilo y ditiolilo. Los anillos que contienen una mezcla de heteroátomos incluyen, pero no se limitan a, anillos de oxatolilo, oxazolilo, tiazolilo, oxadiazolilo, oxatriazolilo, dioxazolilo, oxatiazolilo, oxatolilo, oxazinilo, oxatiazinilo, morfolinilo, tiamorfolinilo, sulfóxido de tiamorfolinilo, oxepinilo, tiepinilo, y diazepinilo. Los anillos condensados que contienen heteroátomos incluyen, pero no se limitan a, anillos de benzofuranilo, tionafeno, indolilo, benzazolilo, purindinilo, piranopirrolilo, isoindazolilo, indoxazinilo, benzoxazolilo, antranililo, benzopiranilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzodiazonilo, naftilridinilo, benzotienilo, piridopiridinilo, benzoxazinilo, xantenilo, acridinilo, y purinilo.

El término "heterocíclico sustituido", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heterocíclico que tiene uno o más sustituyentes que consisten en halógeno, CN, OH, NO₂, amino, alquilo, cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, ariloxi, alquiloxi, alquilcarbonilo, alquilcarboxi, aminoalquilo, y ariltio, cuyos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos. En una realización, un grupo heterocíclico sustituido está sustituido con 1 a 4 sustituyentes.

El término "acilo" se refiere a un grupo -C(O)-, que está sustituido en el átomo de carbono. El grupo acilo puede estar sustituido o puede ser un grupo acilo terminal tal como el grupo HC(O)-. Los sustituyentes pueden incluir cualquier sustituyente indicado Anteriormente para los grupos alquilo, concretamente uno o más sustituyentes que incluyen, pero sin limitación, halógeno, CN, OH, NO₂, amino, arilo, heterocíclico, alcoxi, ariloxi, alquilcarbonilo, alquilcarboxi, y ariltio, cuyos grupos pueden estar opcionalmente sustituidos. Los ejemplos incluyen -C(O)-alcoxi (por ejemplo, -OMe o -OEt) o -C(O)-alquilo en el que el alquilo puede ser lineal o ramificado y opcionalmente sustituido por ejemplo, por un heterocíclico (tal como piridilo).

El término "alcoxi", como se usa en el presente documento, se refiere al grupo O(alquilo), en el que el punto de unión es a través del átomo de oxígeno y el grupo alquilo está opcionalmente sustituido.

El término "ariloxi", como se usa en el presente documento, se refiere al grupo O(arilo), en el que el punto unión es a través del átomo de oxígeno y el grupo arilo está opcionalmente sustituido.

El término "alquiloxi", como se usa en el presente documento, se refiere al grupo alquilOH, en el que el punto unión es a través del grupo alquilo.

El término "ariltio", como se usa en el presente documento, se refiere al grupo S(arilo), en el que el punto unión es a través del átomo de azufre y el grupo arilo puede estar opcionalmente sustituido.

El término "alquilcarbonilo", como se usa en el presente documento, se refiere al grupo C(O)(alquilo), en el que el punto unión es a través del átomo de carbono del resto carbonilo y el grupo alquilo está opcionalmente sustituido.

El término "alquilcarboxi", como se usa en el presente documento, se refiere al grupo C(O)O(alquilo), en el que el punto de unión es a través del átomo de carbono del resto carboxi y el grupo alquilo está opcionalmente sustituido.

El término "aminoalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere tanto a aminas secundarias como terciarias en las que el punto unión es a través del átomo de nitrógeno y los grupos alquilo están opcionalmente sustituidos. Los grupos alquilo pueden ser iguales o diferentes.

El término "halógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a grupos Cl, Br, F, o I.

II. Métodos de Preparación de los Compuestos de la Presente Invención.

Los análogos de rapamicina de fórmula I de la presente invención se preparan a partir de un material de partida de rapamicina. De forma preferente, el material de partida de rapamicina incluye, pero sin limitación, rapamicina, norrapamicina, deoxorapamicina, desmetilrapamicinas, o desmetoxirapamicina, o sales, profármacos, o metabolitos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Sin embargo, alguien experto en la materia podría seleccionar fácilmente un material de partida de rapamicina adecuado que se pueda utilizar para preparar los nuevos análogos de rapamicina de la presente invención.

El término "desmetilrapamicina" se refiere a una clase de compuestos de rapamicina que carecen de uno o más grupos metilo. Ejemplos de desmetilrapamicinas que se puedan usar de acuerdo con la presente invención incluyen 3-desmetilrapamicina (patente de los Estados Unidos de América N° 6.358.969), 7-O-desmetil-rapamicina (patente de los Estados Unidos de América N° 6.399.626), 17-desmetilrapamicina (patente de los Estados Unidos de América N° 6.670.168), y 32-O-desmetilrapamicina, entre otras.

El término "desmetoxirapamicina" se refiere a una clase de compuestos de rapamicina que carecen de uno o más grupos metoxi e incluye, pero sin limitación, 32-desmetoxirapamicina.

Los análogos de rapamicina de fórmula I de la presente invención se preparan, por lo tanto, por combinación de un material de partida de rapamicina y un dienófilo. El término "dienófilo" se refiere a una molécula que reacciona con un 1,3 dieno para dar un producto de cicloadición [4+2]. De forma preferente, el dienófilo utilizado en la presente invención es un nitrosobenceno opcionalmente sustituido. Se pueden utilizar una diversidad de nitrosobencenos en la presente invención e incluyen nitrosobenceno, 2,6-dicloronitrosobenceno, y 1-cloro-2-metil-4-nitrosobenceno, entre otros. Alguien experto en la materia podría seleccionar fácilmente la cantidad de nitrosobenceno que sería eficaz para preparar los análogos de rapamicina de la presente invención. De forma preferente, se utiliza un exceso de nitrosobenceno, y de forma más preferente se utiliza una relación 5:1 de nitrosobenceno con respecto al material de partida de rapamicina. Sin embargo, se pueden utilizar incluso las relaciones 1:1, 2:1, o 3:1 de nitrosobenceno con respecto a la rapamicina como se puede determinar por alguien experto en la materia.

El nitrosobenceno y el material de partida de rapamicina se combinan en un disolvente. El disolvente disuelve preferentemente el nitrosobenceno y/o la rapamicina al entrar en contacto, o disuelve el nitrosobenceno y la rapamicina a medida que avanza la reacción. Los disolventes que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, pero sin limitación, dimetilformamida, dioxano tal como p-dioxano, cloroformo, alcoholes tales como metanol y etanol, acetato de etilo, agua, acetonitrilo, tetrahidrofurano, diclorometano, y tolueno, o combinaciones de los mismos. Sin embargo, alguien experto en la materia podría seleccionar fácilmente un disolvente adecuado en base a la solubilidad del nitrosobenceno y del material de partida de rapamicina, así como en base a la reactividad del disolvente con los mismos. La cantidad de disolvente utilizada depende de la escala de la reacción y de forma específica de la cantidad de material de partida de rapamicina y de nitrosobenceno presentes en la mezcla de reacción. Alguien experto en la materia podría determinar fácilmente la cantidad de disolvente requerida.

Generalmente, la solución que contiene el nitrosobenceno, el material de partida de rapamicina, y el disolvente se mantiene a una temperatura elevada, y de forma preferente a una temperatura que no produce la descomposición de la rapamicina y el nitrosobenceno. En una realización, la solución se mantiene a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 70 °C, y preferentemente a aproximadamente 50 °C. Los componentes se calientan durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la reacción entre la rapamicina y el nitrosobenceno. Alguien experto en la materia usando técnicas conocidas podría monitorizar fácilmente el progreso de la reacción durante el calentamiento y, por lo tanto, determinar la cantidad de tiempo requerida para llevar a cabo la reacción. En una realización preferida, la rapamicina y el nitrosobenceno se combinan con p-dioxano y se mantienen a una temperatura de aproximadamente 50 °C.

El aislamiento y la purificación del análogo de rapamicina se conoce bien por alguien experto en la materia e incluye la recristalización y la cromatografía que incluye, pero sin limitación, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) tal como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase reversa y la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase normal, y la cromatografía de exclusión de tamaño.

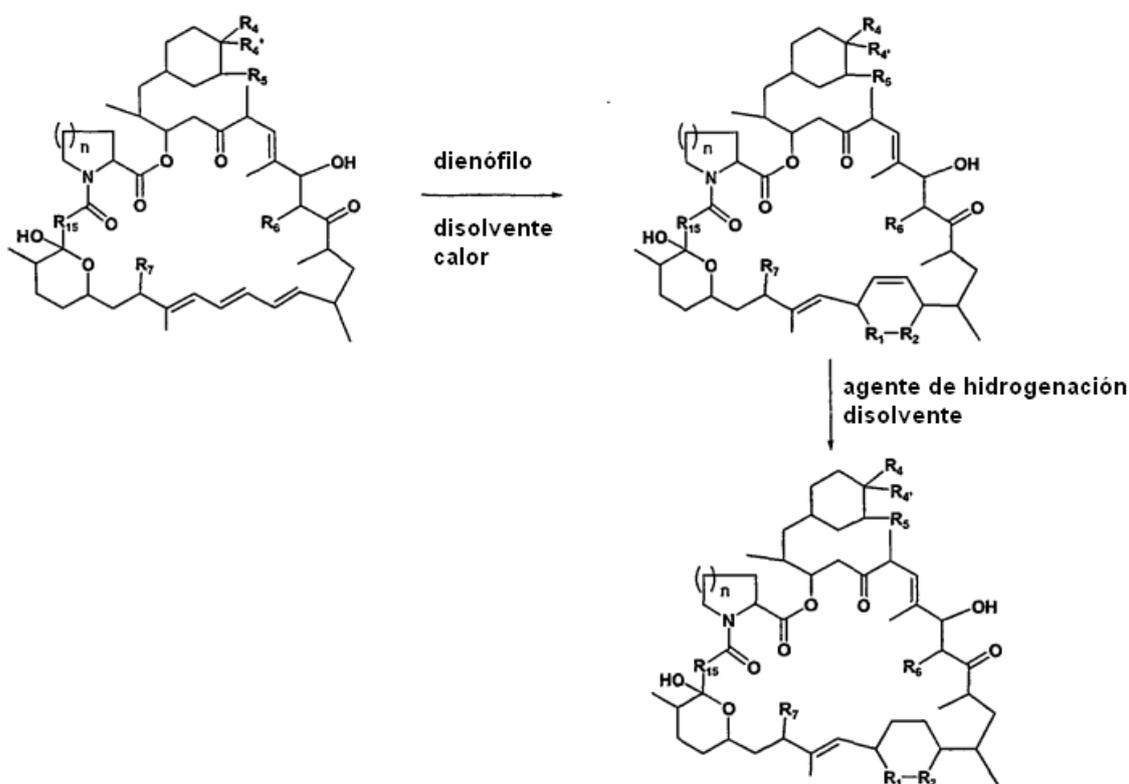
Una vez que se ha obtenido el análogo de rapamicina, se puede reducir para formar un análogo de rapamicina más saturado. Alguien experto en la materia podría seleccionar fácilmente un agente reductor adecuado para su uso en la presente invención. De forma preferente, la reducción del análogo de rapamicina se puede efectuar usando un agente de hidrogenación. Alguien experto en la materia podría seleccionar fácilmente un agente de hidrogenación adecuado para su uso en la presente invención. Generalmente, para llevar a cabo la reducción se usan catalizadores de metales de transición o metales de transición sobre un soporte, de forma preferente sobre un soporte de carbono, entre otros, y en presencia de gas hidrógeno. En una realización preferente, la reducción se realiza usando metal de paladio sobre carbono en presencia de gas hidrógeno.

La reducción del análogo de rapamicina se lleva a cabo generalmente en un disolvente. Se pueden utilizar una diversidad de disolventes en la reducción e incluyen, pero sin limitación, alcoholes tales como el metanol. Sin embargo, alguien experto en la materia podría seleccionar fácilmente un disolvente adecuado para su uso en la

presente invención dependiendo del catalizador de hidrogenación y del análogo de rapamicina que se vaya a reducir. La cantidad de disolvente depende de la escala de la reacción, y de forma específica de la cantidad del análogo de rapamicina que se vaya a reducir.

- 5 La cantidad de agente de hidrogenación utilizada en la presente invención se puede determinar fácilmente por alguien experto en la materia. Sin embargo, alguien experto en la materia podría determinar y ajustar la cantidad de agente de hidrogenación necesaria para llevar a cabo la reducción y para formar los análogos de rapamicina más saturados de la presente invención. De forma adicional, se pueden utilizar una diversidad de aparatos para llevar a cabo la hidrogenación de la presente invención e incluyen aparatos de Parr, entre otros. La selección de un aparato en particular para la hidrogenación se conoce bien por alguien experto en la materia.
- 10 Un procedimiento preferente para la preparación de los análogos de rapamicina de la presente invención se resume en el Esquema 1 siguiente:

Esquema 1



en el que $R_1, R_2, R_4, R_4', R_6, R_7, R_{15}$, y n se definieron anteriormente.

- 15 Los análogos de rapamicina de la presente invención se pueden utilizar para formar sales, profármacos o metabolitos farmacéuticamente aceptables de los mismos, derivados a partir de ácidos o bases farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Estas sales incluyen, pero no se limitan a, las siguientes sales con ácidos minerales o inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido succínico, y ácido maleico. Otras sales incluyen sales con metales alcalinos o metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, calcio o magnesio en la forma de ésteres, carbamatos y otras formas convencionales de "profármaco", que, cuando se administra en dicha forma, se convierte en el residuo activo *in vivo*.
- 20

III. Procedimientos de Uso de los Compuestos de la Presente Invención.

- 25 Los análogos de rapamicina de fórmula I, la y Ib de la presente invención, que incluyen los análogos de rapamicina más y menos saturados, son útiles en aplicaciones relacionadas con trastornos neurológicos (incluyendo trastornos neuromusculares) y trastornos cardiovasculares, entre otros. Los análogos de rapamicina de fórmula I, la y Ib de la presente invención, que incluyen los análogos de rapamicina más y menos saturados, son útiles en trastornos que involucran la disfunción de los canales del ión calcio (Ca^{2+}), tales como las canalopatías del receptor de rianodina ($RyR1, RyR2,$ y $RyR3$) que incluyen, entre otras, hipertermia maligna, enfermedad del núcleo central, taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica y displasia del ventrículo derecho arritmogénica de tipo 2 (ARVD-2). Los

análogos de rapamicina de fórmula I, la y Ib de la presente invención, que incluyen los análogos de rapamicina más y menos saturados, también son útiles en las canalopatías del receptor de dihidropiridina, que incluyen aquellas que resultan de la actividad del receptor de rianodina debido a la actividad de los canales del ión calcio (Ca^{2+}) sensibles a la dihidropiridina. Como se usa en el presente documento, el término "canalopatía" se refiere a una enfermedad o trastorno que involucra la disfunción de un canal de iones.

Las enfermedades y trastornos referidos en el presente documento se agrupan en el presente documento bajo encabezamientos convencionales, *por ejemplo*, trastornos neurológicos y trastornos inflamatorios. Alguien experto en la materia podrá reconocer que las enfermedades o trastornos referidos en el presente documento se pueden agrupar apropiadamente bajo diferentes encabezamientos o bajo múltiples encabezamientos. El agrupamiento de enfermedades y/o trastornos referidos en el presente documento no es una limitación de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de trastornos neurológicos incluidos la enfermedad de Alzheimer; epilepsia; enfermedad de Huntington; enfermedad de Parkinson; apoplejía; lesión en la médula espinal; lesión cerebral traumática; demencia de cuerpos de Lewy; enfermedad de Pick, enfermedad de Niewmann-Pick; angiopatía amiloide; angiopatía amiloide cerebral; amiloidosis sistémica; hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch; miositis por cuerpos de inclusión; deterioro cognitivo leve; síndrome de Down; y trastornos neuromusculares que incluyen esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, y distrofias musculares que incluyen la distrofia de Duchenne, la distrofia muscular de Becker, distrofia muscular facioescapulohumeral (Landouzy-Dejerine), y distrofia muscular cintura-miembro (LGMD); y en la preparación de medicamentos para los mismos. Los análogos de rapamicina también son útiles en el tratamiento de complicaciones debidas a la apoplejía, trauma craneal, o lesión espinal, otras lesiones en el cerebro, y sistema nervioso periférico, sistema nervioso central o sistema neuromuscular, y en la preparación de medicamentos para los mismos.

Los nuevos análogos de rapamicina también son útiles como agentes neuroprotectores. Los análogos de rapamicina de la presente invención también pueden ser útiles como agentes neuroregenerativos, *es decir*, restaurando algunas funciones neurológicas y/o neuromusculares u otras funciones después del comienzo de alguna de las dolencias y/o lesiones, apoplejía, u otro trauma anteriormente citados.

Los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de trastornos cardiovasculares que incluyen, pero no se limitan a: insuficiencia cardíaca congestiva; síndromes arritmogénicos, que incluyen taquicardia paroxismal, repolarización precoz, taquicardia ventricular, taquicardia súbita, arritmias inducidas por el ejercicio, síndrome del QT largo, y taquicardia bidireccional; trastornos tromboembólicos, que incluyen trastornos tromboembólicos cardiovasculares arteriales, trastornos tromboembólicos cardiovasculares venosos, y trastornos tromboembólicos de las cavidades del corazón; aterosclerosis; reestenosis; enfermedad de las arterias periféricas; cirugía de injerto de derivación coronaria; enfermedad de la arteria carótida; arteritis; miocarditis; inflamación cardiovascular; inflamación vascular; enfermedad cardíaca coronaria (CHD); angina inestable (UA); angina refractaria inestable; angina estable (SA); angina crónica estable; síndrome coronario agudo (ACS); infarto de miocardio primario o recurrente; infarto agudo de miocardio (AMI); infarto de miocardio; infarto de miocardio sin onda Q; infarto de miocardio sin elevación del segmento ST; enfermedad arterial coronaria; insuficiencia cardíaca isquémica; isquemia cardíaca; isquemia; muerte súbita por isquemia; ataque isquémico transitorio; apoplejía; enfermedad arterial oclusiva periférica; trombosis venosa; trombosis venosa profunda; tromboflebitis; embolia arterial; trombosis arterial coronaria; trombosis arterial cerebral; embolia cerebral; embolia de riñón; embolia pulmonar; trombosis que son resultado de (a) válvulas protésicas u otros implantes, (b) catéteres permanentes, (c) endoprótesis vasculares, (d) derivación cardiopulmonar, (e) hemodiálisis, u (f) otros procedimientos en que la sangre se expone a una superficie artificial que promueve la trombosis; trombosis que son resultado de aterosclerosis, cirugía o complicaciones de la cirugía, inmovilización prolongada, fibrilación arterial, trombofilia congénita, cáncer, diabetes, efectos de medicaciones u hormonas, y complicaciones del embarazo; arritmias cardíacas que incluyen arritmias supraventriculares, arritmias auriculares, aleteo auricular, fibrilación auricular, u otras enfermedades enumeradas en Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 2 Volume Set, 6th Edition, 2001, Eugene Braunwald, Douglas P. Zipes, Peter Libby, Douglas D. Zipes; y en la preparación de medicamentos para los mismos.

En una realización adicional, la enfermedad cardiovascular es: aterosclerosis; enfermedad cardíaca coronaria (CHD); reestenosis; enfermedad arterial periférica; cirugía de injerto de derivación coronaria; enfermedad de la arteria carótida; arteritis; miocarditis; inflamación cardiovascular; inflamación vascular; angina inestable (UA); angina refractaria inestable; angina estable (SA); angina estable crónica; síndrome coronario agudo (ACS); infarto de miocardio; infarto agudo de miocardio (AMI), que incluye infarto de miocardio primario o recurrente, infarto del miocardio sin onda Q, infarto de miocardio sin elevación del segmento ST e infarto de miocardio con elevación del segmento ST.

En aún otra realización adicional, la enfermedad cardiovascular es: aterosclerosis; enfermedad cardíaca coronaria (CHD); angina inestable (UA); angina refractaria inestable; angina estable (SA); angina estable crónica; síndrome coronario agudo (ACS); infarto de miocardio; infarto agudo de miocardio (AMI), que incluye infarto de miocardio primario o recurrente, infarto del miocardio sin onda Q, infarto de miocardio sin elevación del segmento ST e infarto de miocardio con elevación del segmento ST.

Los análogos de rapamicina de fórmula I, la, y Ib de la presente invención también han mostrado poseer actividad

inmunosupresora, y de esta manera son útiles como agentes antiinflamatorios para el tratamiento de trastornos inflamatorios, que incluyen sin limitación, trastornos autoinmunes (*por ejemplo*, lupus), trastornos inflamatorios de la piel, trastornos inflamatorios intestinales, asma y trastornos atópicos, y rechazo al trasplante o injerto. Por consiguiente, los análogos de rapamicina son útiles en el tratamiento de trastornos inflamatorios y en la preparación de medicamentos para los mismos, que incluyen sin limitación, trastornos autoinmunes, *por ejemplo*, lupus eritematoso sistémico (LES), trastornos artríticos (*por ejemplo*, artritis reumatoide, artritis psoriática, osteoartritis, espondilitis anquilosante), diabetes mellitus (tipo I), esclerosis múltiple, miastenia gravis, vasculitis; trastornos inflamatorios de la piel (*por ejemplo*, psoriasis, dermatitis y esclerodermia); trastornos inflamatorios intestinales (*por ejemplo*, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); asma y trastornos atópicos (*por ejemplo*, alergia); y rechazo al trasplante o injerto y enfermedad injerto contra huésped.

Los presentes compuestos de fórmula I, Ia, y Ib también son útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades neoplásicas benignas o malignas o carcinomas y adenocarcinomas, y en la preparación de medicamentos para los mismos. Uno de tales compuestos es 9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-37-fenil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxi-imino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona. Otro de tales compuestos es 37-(4-cloro-3-metilfenil)-9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona. Los carcinomas y adenocarcinomas que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, carcinomas o adenocarcinomas del endometrio, ovario, mama, colon, renales, de próstata, pituitaria, meningioma u otros tumores dependientes de hormonas.

Los requerimientos de dosificación de los análogos de rapamicina de la presente invención pueden variar dependiendo de la afección, la gravedad de los síntomas que se presentan y del sujeto particular que se está tratando. Alguien experto en la materia podría determinar fácilmente la cantidad requerida de análogo de rapamicina. En una realización, se administran de aproximadamente 0,5 a 200 mg. En una realización adicional, se administran de aproximadamente 0,5 a 100 mg. En otra realización, se administran de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 75 mg. En aún otra realización, se administran de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 mg. En otra realización, se administran de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg, particularmente cuando se usa en combinación con otro agente. En otra realización adicional, se administran de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 mg. En aún otra realización, se administran de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mg. El tratamiento se puede iniciar con dosificaciones de análogo de rapamicina más pequeñas que las que se requieren para producir un efecto deseado y generalmente menores que la dosis óptima del análogo de rapamicina. A partir de entonces, la dosificación se puede aumentar hasta que se alcanza el efecto óptimo en esas circunstancias. Las dosificaciones precisas se determinarán por la administración del médico en base a la experiencia con el sujeto individual que se está tratando. En general, las composiciones de la presente invención se administran de la manera más deseable a una concentración que generalmente permitirá resultados efectivos sin causar ninguna lesión o efectos secundarios perjudiciales.

IV. Procedimientos de Preparación de Composiciones Administrables que Contienen Análogos de Rapamicina.

En un aspecto, la presente invención incluye procedimientos para la preparación de una composición farmacéutica que contiene uno o más análogos de rapamicina de la presente invención. Como se usa en el presente documento, la referencia a composiciones que contienen "un análogo de rapamicina" o "el análogo de rapamicina" de la presente invención tiene por objeto abarcar composiciones que contienen uno o más análogos de rapamicina de la presente invención. La composición se puede administrar a un sujeto mamífero mediante diversas vías diferentes y se administra de forma deseable por vía oral en forma sólida o líquida.

Las formas sólidas, que incluyen comprimidos, cápsulas y comprimidos encapsulados, que contienen el análogo de rapamicina se pueden formar mediante la mezcla del análogo de rapamicina con uno o más de los componentes descritos anteriormente. En una realización, los componentes de la composición se mezclan secos o húmedos. En otra realización, los componentes son granulados secos. En una realización adicional, los componentes se suspenden o disuelven en un líquido y se añaden a una forma adecuada para la administración a un sujeto mamífero.

Las formas líquidas que contienen el análogo de rapamicina se pueden formar mediante la disolución o suspensión del análogo de rapamicina en un líquido adecuado para la administración a un sujeto mamífero.

Las composiciones que contienen el análogo de rapamicina de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con la presente invención mediante la combinación del análogo de rapamicina y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones descritas en el presente documento que contienen el análogo de rapamicina se pueden formular en cualquier forma adecuada para la vía de administración deseada usando una cantidad farmacéuticamente eficaz del análogo de rapamicina. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención se pueden administrar mediante una vía tal como la oral, dérmica, transdérmica, intrabronquial, intranasal, intravenosa, intramuscular,

subcutánea, parenteral, intraperitoneal, intranasal, vaginal, rectal, sublingual, intracraneal, epidural, intratraqueal o mediante liberación sostenida. De forma preferente, la administración es oral.

5 La composición de comprimido de dosificación oral de la presente invención también se puede usar para hacer comprimidos de dosificación oral que contengan derivados del análogo de rapamicina que incluyen, pero no se limitan a, ésteres, carbamatos, sulfatos, éteres, oximas, carbonatos, y similares que son conocidos por los expertos en la materia.

10 Una cantidad farmacéuticamente efectiva del análogo de rapamicina puede variar dependiendo del compuesto o compuestos específicos, la forma de suministro, la gravedad de la afección que se está tratando, y cualquier otro ingrediente activo usado en la composición. El régimen de dosificación también se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Se pueden suministrar diariamente varias dosis divididas, *por ejemplo*, en dosis divididas de dos a cuatro veces al día, o se puede suministrar una dosis única. Sin embargo, las dosis se pueden reducir o aumentar de forma proporcional según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. En una realización, el suministro es en base diaria, semanal o mensual. En otra realización, el suministro es diario. Sin embargo, las dosificaciones diarias se pueden disminuir o aumentar en base a los suministros periódicos.

15 Los análogos de rapamicina de la presente invención se pueden combinar con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen, pero sin limitación, vehículos sólidos y líquidos que son compatibles con las composiciones de la presente invención. Dichos vehículos incluyen adyuvantes, jarabes, elixires, diluyentes, aglutinantes, lubricantes, tensioactivos, agentes granulantes, agentes desintegrantes, emolientes, quelantes de metales, reguladores de pH, tensioactivos, cargas, desintegrantes, y combinaciones de los mismos, entre otros. En una realización, el análogo de rapamicina se combina con quelantes de metales, reguladores de pH, tensioactivos, cargas, desintegrantes, lubricantes y aglutinantes.

Los adyuvantes pueden incluir, pero sin limitación, agentes aromatizantes, agentes colorantes, conservantes, y antioxidantes suplementarios, que pueden incluir vitamina E, ácido ascórbico, hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA).

25 Los aglutinantes pueden incluir, pero sin limitación, celulosa, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, celulosa no cristalina, polipropilpirrolidona, polivinilpirrolidona (povidona, PVP), gelatina, goma arábiga, polietilenglicoles, almidón, azúcares tales como sacarosa, caolín, dextrosa, y lactosa, colesterol, tragacanto, ácido esteárico, gelatina, caseína, lecitina (fosfátido), alcohol cetílico, alcohol palmítico, ceras de ésteres cetílicos, dextratos, dextrina, monooleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerilo, éteres de alquilo y polioxietileno, derivados de aceite de ricino polioxietileno, estearatos de polioxietileno, alcohol polivinílico, y gelatina, entre otros. En una realización, el aglutinante es povidona, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, o gelatina. En otra realización, el aglutinante es povidona.

35 Los lubricantes pueden incluir estearato de magnesio, ácido silícico anhídrido ligero, talco, ácido esteárico, lauril sulfato sódico y fumarato de estearilo sódico, entre otros. En una realización, el lubricante es estearato de magnesio, ácido esteárico o fumarato de estearilo sódico. En otra realización, el lubricante es estearato de magnesio.

Los agentes granulantes pueden incluir, pero sin limitación, dióxido de silicio, celulosa microcristalina, almidón, carbonato cálcico, pectina, crospovidona y poliplasdon, entre otros.

40 Los agentes desintegrantes o desintegrantes pueden incluir croscarmelosa de sodio, almidón, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa sustituida, bicarbonato sódico, fosfato cálcico, citrato cálcico, almidón glicolato sódico y almidón o crospovidona pregelatinizados, entre otros. En una realización, el agente desintegrante es croscarmelosa de sodio.

Los emolientes pueden incluir, pero sin limitación, alcohol estearílico, aceite de visón, alcohol cetílico, alcohol oléico, laurato de isopropilo, polietilenglicol, aceite de oliva, vaselina, ácido palmítico, ácido oléico, y miristato de miristilo.

45 Los tensioactivos pueden incluir polisorbatos, ésteres de sorbitan, poloxamer, o lauril sulfato sódico. En una realización, el tensioactivo es lauril sulfato sódico.

Los quelantes de metales pueden incluir agentes quelantes fisiológicamente aceptables que incluyen ácido edético, ácido málico, o ácido fumárico. En una realización, el quelante de metales es ácido edético.

50 Los reguladores de pH también se pueden utilizar para ajustar el pH de una solución que contiene el análogo de rapamicina de aproximadamente 4 a aproximadamente 6. En una realización, el pH de una solución que contiene el análogo de rapamicina se ajusta a un pH aproximadamente 4,6. Los reguladores de pH pueden incluir agentes fisiológicamente aceptables que incluyen ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido fumárico o ácido málico, o las sales de los mismos. En una realización, el regulador de pH es ácido cítrico.

55 Las cargas que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen lactosa anhidra, celulosa microcristalina, manitol, fosfato cálcico, almidón pregelatinizado, o sacarosa. En una realización, la carga es lactosa anhidra. En otra realización, la carga es celulosa microcristalina.

5 En una realización, las composiciones que contienen el análogo de rapamicina de la presente invención se suministran por vía oral mediante un comprimido, comprimido encapsulado o cápsula, microcápsula, polvo dispersable, gránulo, suspensión, jarabe, elixir y aerosol. De forma deseable, cuando las composiciones que contienen el análogo de rapamicina se suministran de forma oral, el suministro es mediante comprimidos y cápsulas rellenas de sólido o rellenas de líquido.

10 En otra realización, las composiciones que contienen el análogo de rapamicina se pueden suministrar de forma intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral e intraperitoneal en forma de soluciones, suspensiones, dispersiones inyectables estériles y polvos que se convierten en un fluido que sea capaz de salir fácilmente por una jeringuilla. Dichas composiciones inyectables son estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y están libres de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

En una realización adicional, las composiciones que contienen el análogo de rapamicina se pueden suministrar por vía rectal en forma de un supositorio convencional.

En otra realización, las composiciones que contienen el análogo de rapamicina se pueden suministrar por vía vaginal en la forma de un supositorio, crema, gel, anillo o dispositivo intrauterino recubierto (IUD) convencionales.

15 En otra realización, las composiciones que contienen el análogo de rapamicina se pueden suministrar mediante el recubrimiento o impregnación de una estructura de soporte, *es decir*, una estructura capaz de contener o soportar un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable que contiene un compuesto de la presente invención, *por ejemplo*, endoprótesis vasculares o derivaciones vasculares, endoprótesis vasculares coronarias, endoprótesis vasculares periféricas, catéteres, injertos arterio-venosos, injertos de derivación, y balones de suministro de fármacos para uso vascular. En una realización, los recubrimientos adecuados para el uso incluyen, pero no se limitan a, recubrimientos poliméricos compuestos de varios materiales poliméricos en los que el compuesto de la presente invención es considerablemente soluble. Las estructuras de soporte y los procedimientos de recubrimiento o impregnación, *por ejemplo*, los descritos en la patente de los Estados Unidos de América N° 6.890.546, se conocen por los expertos en la materia y no son una limitación de la presente invención.

20 En aún otra realización, las composiciones que contienen el análogo de rapamicina se pueden suministrar por vía intranasal o intrabronquial en forma de un aerosol.

30 Los análogos de rapamicina se suministran por vía oral así como por vía intravenosa, intramuscular, o subcutánea. Los vehículos sólidos incluyen almidón, lactosa, fosfato dicálcico, celulosa microcristalina, sacarosa y caolín, mientras que los vehículos líquidos incluyen agua estéril, polietilenglicoles, tensioactivos no iónicos, y aceites comestibles tales como los aceites de maíz, cacahuete y sésamo, según sean adecuados a la naturaleza del ingrediente activo y a la forma particular de administración deseada. Se incluyen de forma ventajosa los adyuvantes empleados habitualmente en la preparación de composiciones farmacéuticas, tales como agentes aromatizantes, agentes colorantes, agentes conservantes y antioxidantes, por ejemplo, vitamina E, ácido ascórbico, BHT y BHA.

35 Las composiciones farmacéuticas preferentes desde el punto de vista de la facilidad de preparación y administración son las composiciones sólidas, en particular comprimidos y cápsulas rellenas de líquido o rellenas de sólido. Se prefieren la administración oral de los compuestos.

40 Los análogos de rapamicina también se suministran por vía parenteral o intraperitoneal. Las soluciones o suspensiones de estos compuestos activos como una base libre o una sal farmacológicamente aceptable se preparan en agua mezclada de forma adecuada con un tensioactivo tal como la hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se preparan en glicerol líquido, polietilenglicoles y mezclas de los mismos en aceites. En las condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

45 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma es estéril y fluida de forma que sea capaz de salir fácilmente por una jeringuilla. Es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se preserva de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo es un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol (*por ejemplo*, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos, y aceite vegetal.

50 V. Equipos de la Presente Invención

La presente invención también proporciona equipos o envases que contienen los análogos de rapamicina. Los equipos de la presente invención pueden incluir el análogo de rapamicina de la presente invención y un vehículo adecuado para la administración a un sujeto mamífero como se indicó anteriormente. Los equipos también pueden contener los reactivos requeridos para preparar los análogos de rapamicina de la presente invención e incluyen una rapamicina, y un nitrosobenceno opcionalmente sustituido, y un disolvente.

Los equipos pueden incluir opcionalmente otros reactivos para formar otros análogos de rapamicina e incluyen

agentes de hidrogenación.

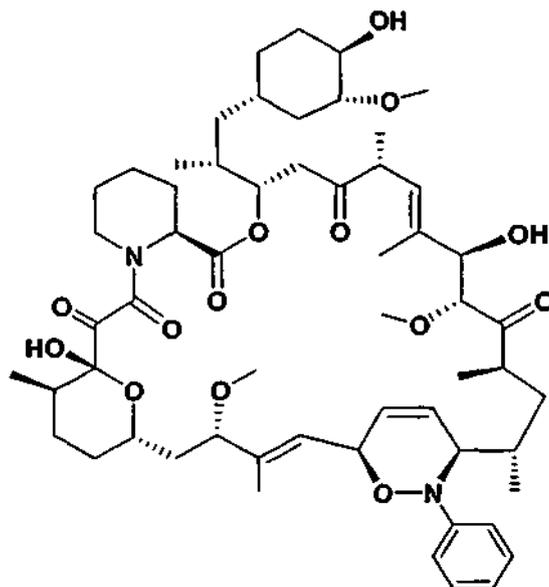
El equipo puede contener adicionalmente instrucciones para la realización de las reacciones de la presente invención. También se pueden proporcionar en un equipo otros productos químicos adecuados, guantes desechables, instrucciones de descontaminación, filamentos o contenedores para aplicación, y cubetas para la preparación de muestras.

5

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente invención y no limitan el ámbito de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1



- 10 La Tabla 1 proporciona los datos del espectro de masas (MS) y la Figura 1 proporciona el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) para el compuesto producido mediante las dos rutas alternativas siguientes.

Tabla 1

Masa Neutra Teórica: 1020,59226					
Resultados de Masa Exacta de Alta Resolución					
Aducto	Experimental	Exacta	mmu	ppm	IR %
$[M+H]^{1+}$	1021,59780	1021,59954	-1,74	-1,70	100,0
$[M+Na]^{1+}$	1043,57740	1043,58148	-4,08	-3,91	17,8
$[M+NH_4]^{1+}$	1038,62305	1038,62608	-3,03	-2,92	1,2
$[M+2H]^{2+}$	511,30109	511,30341	-2,32	-4,53	1,8
$[M+CH_3OH+H]^{1+}$	1053,62596	1053,62575	0,21	0,20	1,5

A. Ruta 1

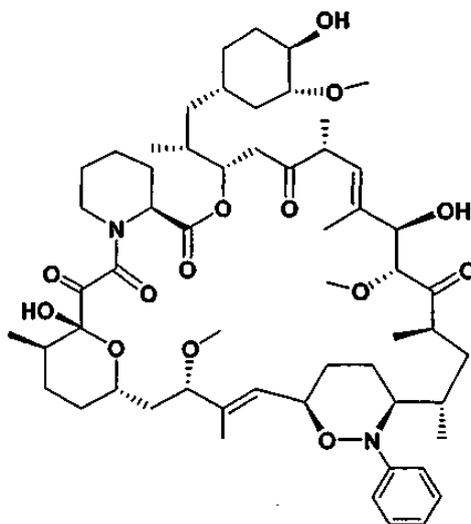
- 15 La rapamicina (2,5 g, 2,73 mmol) se disolvió en 200 ml de p-dioxano. A esta solución se añadió, gota a gota, una solución de nitrosobenceno (1,50 g, 5 equiv.) en 200 ml de p-dioxano. La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 64 horas, y después se cromatografiaron los productos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase reversa (columna: 200 x 50 mm YMC ODS-A, fase móvil: 80% de metanol:agua, caudal progresivo desde 10 ml/min hasta 35 ml/min en 10 minutos, después se mantiene a 35 ml/min durante otros 65 minutos) para producir 1,22 g del producto (rendimiento del 44%, $t_R = 12,1$ min, condiciones analíticas de HPLC: columna = YMC ODS-A S-3 120 A, fase móvil/gradiante: 95% de agua (+ 0,025% de ácido fórmico)/acetonitrilo (+ 0,025% de ácido
- 20

fórmico) hasta 5% de agua en 6 minutos, mantenido al 5% durante 9 minutos, caudal = 0,30 ml/min).

B. Ruta 2 - Ruta Alternativa

La rapamicina (0,3 g, 0,328 mmol) se disolvió en 5 ml de tolueno con calentamiento suave. A esta solución se añadió, gota a gota, una solución de nitrosobenceno (0,1 g, 3 equiv.) en 5 ml de tolueno. La mezcla de reacción se agitó a 70 °C durante 16 horas, y después se cromatografiaron los productos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase reversa (columna: 200 x 50 mm YMC ODS-A con protector 50 x 20, fase móvil: 80 a 85% de metanol:agua en 40 minutos, caudal = 20 ml/min) para producir 0,139 g del producto (rendimiento del 42%, $t_R = 12,1$ min, condiciones analíticas de HPLC: columna = YMC ODS-A S-3 120 A, fase móvil/gradiente: 95% de agua (+ 0,025% de ácido fórmico)/acetonitrilo (+ 0,025% de ácido fórmico) hasta 5% de agua en 6 minutos, mantenido al 5% durante 9 minutos, caudal = 0,30 ml/min).

Ejemplo 2



La Tabla 2 proporciona los datos del espectro de masas (MS) y la Figura 2 proporciona el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) para el compuesto producido mediante las dos rutas alternativas siguientes.

15 A. Ruta 1

El compuesto preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 (0,29 g, 0,284 mmol) se disolvió en 7 ml de metanol en tubo de ensayo de 18 mm, y se añadió una punta de espátula de catalizador de Pd/C (Aldrich). La mezcla se hidrogenó en un aparato de Parr durante 15 minutos a 2,0 atmósferas de H₂. Los productos se cromatografiaron mediante HPLC de fase reversa (columna: 250 x 20 mm YMC ODS-A con protector 50 x 20, fase móvil: metanol:agua al 80% durante 15 minutos, después hasta el 85% en 5 minutos, después se mantuvo al 85% durante 20 minutos, caudal = 20 ml/min) para producir 0,089 g del producto (rendimiento del 31%, $t_R = 12,6$ min, condiciones analíticas de HPLC: columna = YMC ODS-A S-3 120 A, fase móvil/gradiente: 95% de agua (+ 0,025% de ácido fórmico) /acetonitrilo (+ 0,025% de ácido fórmico) hasta 5% de agua en 6 minutos, mantenido al 5% durante 9 minutos, caudal = 0,30 ml/min)

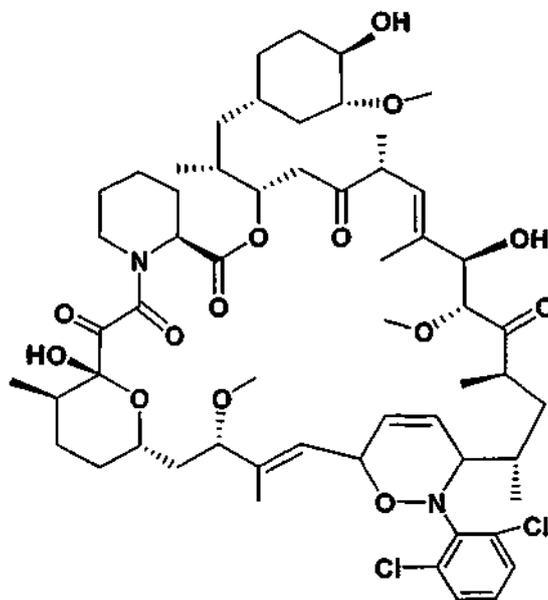
25 B. Ruta 2 - Ruta Alternativa

El compuesto preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 (9,85 g, 9,65 mmol) se disolvió en 50 ml de metanol, y se añadieron tres puntas de espátula de catalizador de Pd/C (Aldrich). La mezcla se hidrogenó en un aparato de Parr durante 2,5 horas a 2,5 atmósferas de H₂. Los productos se cromatografiaron mediante HPLC de fase reversa (columna: 250 x 50 mm YMC ODS-A, fase móvil: metanol:agua al 80% durante 40 minutos, después hasta el 85% en 5 minutos, después se mantuvo al 85% durante 35 minutos, caudal = 35 ml/min) para producir 3,35 g del producto (rendimiento del 15%, $t_R = 12,2$ min, condiciones analíticas de HPLC: columna = YMC ODS-A S-3 120 A, fase móvil/gradiente: 95% de agua (+ 0,025% de ácido fórmico) /acetonitrilo (+ 0,025% de ácido fórmico) hasta 5% de agua en 6 minutos, mantenido al 5% durante 9 minutos, caudal = 0,30 ml/min)

Tabla 2

Masa Neutra Teórica: 1022,60791					
Resultados de Masa Exacta de Alta Resolución					
Aducto	Experimental	Exacta	mmu	ppm	IR %
[M+H] ¹⁺	1023,61722	1023,61519	2,03	1,99	100,0
[M+Na] ¹⁺	1045,59943	1045,59713	2,30	2,20	10,5

Ejemplo 3

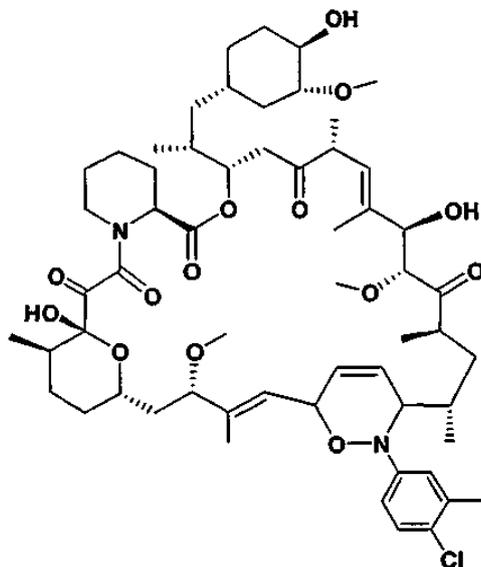


- 5 La rapamicina (0,25 g, 0,274 mmol) se disolvió en 5 ml de tolueno con calentamiento suave. A esta solución se añadió, gota a gota, una solución de 2,6-dicloronitrosobenceno (0,144 g, 3 equiv.) en 7 ml de tolueno. La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 36 horas, y después los productos se cromatografiaron mediante HPLC de fase reversa (columna: 250 x 20 mm YMC ODS-A con protector 50 x 20, fase móvil: 80 a 85% de metanol:agua en 40 minutos, caudal = 20 ml/min) para producir 0,046 g del producto (rendimiento del 15%, t_R = 13,0 minutos, condiciones analíticas de HPLC: columna = YMC ODS-A S-3 120 A, fase móvil/gradiente: 95% de agua (+ 0,025% de ácido fórmico)/acetonitrilo (+ 0,025% de ácido fórmico) hasta 5% de agua en 6 minutos, mantenido al 5% durante 9 minutos, caudal = 0,30 ml/min). Los datos de MS se proporcionan en la Tabla 3 y la Figura 3 proporciona el espectro RMN.

Tabla 3

Masa Neutra Teórica: 1088,51431					
Resultados de Masa Exacta de Alta Resolución					
Aducto	Experimental	Exacta	mmu	ppm	IR %
[M+H] ¹⁺	1089,52125	1089,52159	-0,34	-0,31	19,1
[M+Na] ¹⁺	1111,50044	1111,50353	-3,09	-2,78	18,1
[M+NH ₄] ¹⁺	1106,54443	1006,54813	-3,70	-3,35	1,2

Ejemplo 4

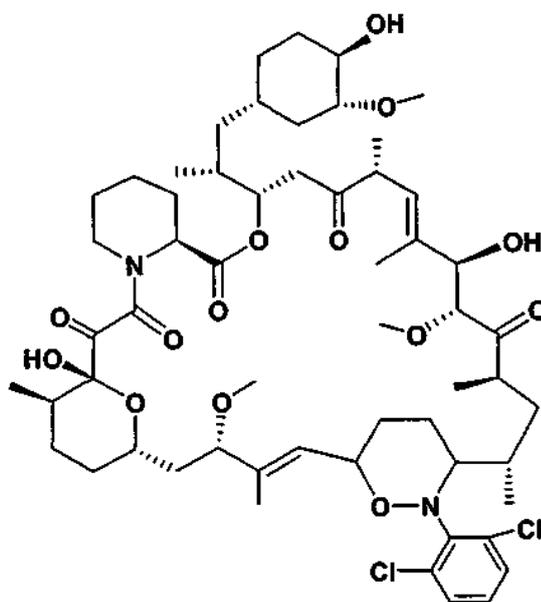


5 La síntesis de este ejemplo se realizó como se describe en el Ejemplo 3 y empleando 0,05 g de rapamicina y 0,042 g de 1-cloro-2-metil-4-nitrosobenceno para dar 0,012 g del producto (rendimiento del 20%, $t_R = 12,8$ min). Los datos de MS se proporcionan en la Tabla 4 y la Figura 4 proporciona el espectro RMN.

Tabla 4

Masa Experimental	Fórmula Elemental (propuesta)	Masa Prevista	Δ (mmu)	Δ (ppm)	Asignación de Iones (propuesta)
1091,55815	$C_{58}H_{85}ClN_2O_{14}Na^{1+}$	1091,55815	0,00	0,00	$[M+Na]^{1+}$
936,54361	$C_{51}H_{79}NO_{13}O_{14}Na^{1+}$	936,54436	-0,75	-0,80	$[M+Na]^{1+}-C_7H_6ClNO$

Ejemplo 5



10

El producto del Ejemplo 3 (0,046 g, 0,0422 mmol) se disolvió en 5 ml de metanol en un tubo ensayo de 18 mm, y se

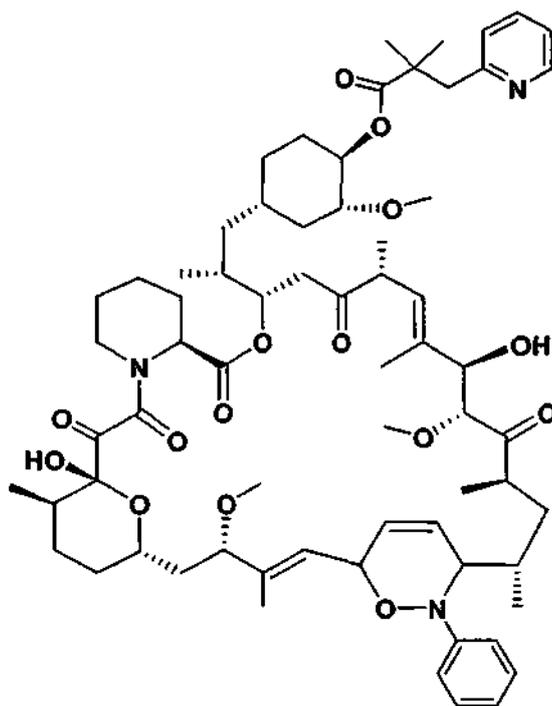
añadió una punta de espátula de catalizador de Pd/C (Aldrich). La mezcla se hidrogenó en un aparato de Parr durante 60 minutos a 3 atmósferas de H₂. Los productos se cromatografiaron mediante HPLC de fase reversa (columna: 250 x 20 mm YMC ODS-A con protector 50 x 20, fase móvil: metanol:agua al 85% hasta el 90% en 15 minutos, después se mantuvo al 90% durante 25 minutos, caudal = 20 ml/min) para producir 0,005 g del producto (rendimiento del 11%, t_R = 10,0 minutos, condiciones analíticas de HPLC: columna = YMC ODS-A S-3 120 A, fase móvil/gradiente: 95% de agua (+ 0,025% de ácido fórmico)/acetonitrilo (+ 0,025% de ácido fórmico) hasta 5% de agua en 6 minutos, mantenido al 5% durante 9 minutos, caudal = 0,30 ml/min). Los datos de MS se proporcionan en la Tabla 5 y la Figura 5 proporciona el espectro RMN.

Tabla 5

Masa Neutra Teórica: 1090,52996					
Resultados de Masa Exacta de Alta Resolución					
Aducto	Experimental	Exacta	mmu	ppm	IR %
[M+H] ¹⁺	1091,53497	1091,53724	-2,27	-2,08	4,3
[M+Na] ¹⁺	1113,52166	1113,51918	2,48	2,23	4,8
[M+NH ₄] ¹⁺	1108,56627	1108,56378	2,49	2,24	15,5

10

Ejemplo 6



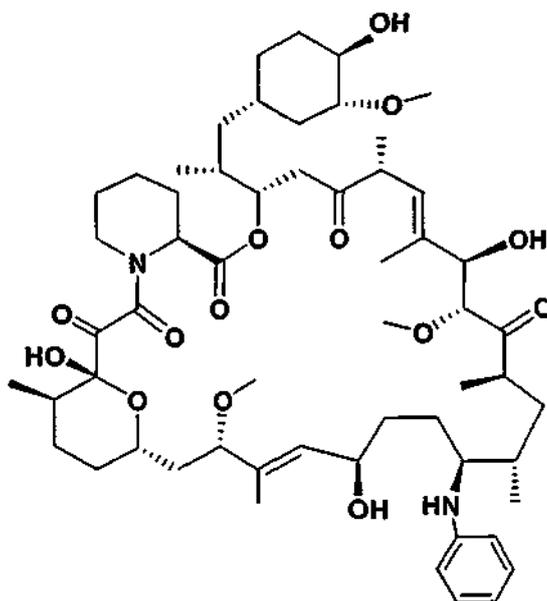
La síntesis de este ejemplo se realizó como se describe en el Ejemplo 3 y usando 0,108 g (0,099 mmol) de 42-éster de rapamicina con ácido 2,2-dimetil-3-(piridina-2-il)-propiónico (preparado de acuerdo con el procedimiento de la patente de los Estados Unidos de América N° 5.385.908) y 0,032 g de nitrosobenceno (0,297 mmol, 3 equiv.). La reacción se agitó a 70 °C durante 40 horas y después se cromatografiaron los productos mediante HPLC de fase reversa (columna: 250 x 20 mm YMC ODS-A con protector 50 x 20, fase móvil: 80 a 85% de metanol:agua en 15 minutos, después hasta el 90% de metanol en 10 minutos, después se mantuvo al 90% durante 15 minutos, caudal = 20 ml/min) para producir 0,007 g del producto (rendimiento del 6%, t_R = 13,0 minutos). Los datos de MS se muestran en la Tabla 6 y la Figura 6 proporciona el espectro RMN.

20

Tabla 6

Masa Neutra Teórica: 1181,67632					
Resultados de Masa Exacta de Alta Resolución					
Aducto	Experimental	Exacta	mmu	ppm	IR %
$[M+H]^+$	1182,68360	1182,68747	3,87	3,28	23,2
$[M+2H]^{2+}$	591,84544	591,84715	1,71	2,90	79,6
$[M+H+Na]^{2+}$	602,83641	602,83743	1,02	1,70	34,1

Ejemplo 7



- 5 El compuesto preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 (0,031 g, 0,03 mmol) se disolvió en 5 ml de metanol en un tubo de ensayo de 18 mm, y se añadió una punta de espátula de catalizador de Pd/C (Aldrich). La mezcla se hidrogenó en un aparato de Parr durante 30 minutos a 2,0 atmósferas de H₂. Los productos se cromatografiaron mediante HPLC de fase reversa (columna: 250 x 20 mm YMC ODS-A con protector 50 x 20, fase móvil: metanol:agua al 80% durante 15 minutos, después hasta el 85% en 5 minutos, después se mantuvo al 85% durante 20 minutos, caudal = 20 ml/min) para producir 0,016 g del producto (rendimiento del 55%, t_R = 9,95 min, condiciones analíticas de HPLC: columna = YMC ODS-A S-3 120 A, fase móvil/gradiente: 95% de agua (+ 0,025% de ácido fórmico) /acetonitrilo (+ 0,025% de ácido fórmico) hasta 5% de agua en 6 minutos, mantenido al 5% durante 9 minutos, caudal = 0,30 ml/min). Los datos de MS se proporcionan en la Tabla 7:

Resultados de Masa Exacta de Alta Resolución					
Aducto	Experimental	Exacta	mmu	ppm	IR %
$[M+H]^{1+}$	1025,62887	1025,63084	-1,97	-1,92	38,0

15 Ejemplo 8

- Se prepararon cultivos de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas como se describe en Pong et al., J. Neurochem. 69: 986-994, 1997, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Se recogieron fetos de ratas de día embrionario 15 (E15) y se diseccionaron en tampón salino fosfato (PBS) con refrigeración en hielo. Se extrajo por disección la parte ventral de tejido que afecta a la región dopaminérgica mesencefálica. Las piezas de tejido diseccionadas se juntaron y se transfirieron a un medio enzimático de disociación que contenía 20 IU/ml de papaína en una solución salina Earle balanceada (Worthington Biochemical, Freehold, NJ, USA) y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Después de la disociación enzimática, la solución de papaína se aspiró y el tejido se trituró mecánicamente con una pipeta Pasteur de vidrio pulida al fuego en un medio completo (volúmenes iguales de medio esencial mínimo (MEM) y mezcla de nutrientes F-12 (GibcoBRL) con

un suplemento de 0,1 mg/ml de apotransferrina y 2,5 µg/ml de insulina) que contenía 2,000 IU/ml de DNasa y 10 mg/ml de inhibidor de la proteasa ovomucoide.

5 Para los experimentos de captación de dopamina, se sembraron suspensiones de células individuales en un medio completo en placas de 24 pocillos recubiertas con poli-L-ornitina y laminina. Los cultivos se mantuvieron durante siete días antes de la fase experimental. Los cultivos se pretrataron con diversas concentraciones del compuesto durante 24 horas, y después se expusieron a MPP+ 10 mM durante una hora. Después de una hora de incubación, el medio se cambió tres veces y se añadió compuesto recién preparado durante otras 48 horas.

10 Después de 48 horas de crecimiento de los cultivos de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas seguido de la exposición a MPP+, se realizó la captación de la 3H-dopamina de alta afinidad usando un procedimiento modificado descrito por Prochiantz et al., Nature 293: 570-572, 1981, que se incorpora en el presente documento como referencia. Los cultivos se lavaron con PBS precalentado que contenía glucosa 5,6 mM y ácido ascórbico 1 mM. Después, los cultivos se incubaron durante 15 minutos a 37 °C con 3H-dopamina 50 nM (31 Ci/mmol, DuPont-NEN, Wilmington, DE, USA). Los cultivos se lavaron dos veces con tampón y se lisaron con NaOH 0,5 N. El lisado se transfirió a un vial de centelleo que contenía un combinado de centelleo Ultima Gold y se determinó la radiactividad con un contador de centelleo en medio líquido. De forma alternativa, los lisados de los cultivos se pueden lavar dos veces con tampón, incubarse durante dos horas a temperatura ambiente con un combinado de centelleo Optiphase Supermix (Wallac Scintillation Products, Gaithersburg, MD, USA), y medirse la radiactividad con un contador de centelleo en medio líquido.

20 Se prepararon los cultivos de neuronas corticales disociadas como se ha descrito previamente (Pong et al., 2001). En resumen, se recolectaron y diseccionaron los fetos de rata de día embrionario 15 con refrigeración en hielo. Las cortezas diseccionadas se juntaron y se transfirieron a un medio enzimático de disociación que contenía papaína. Después de 30 minutos, el tejido se trituró mecánicamente con una pipeta Pasteur de vidrio pulida al fuego. Las suspensiones de células individuales en medio completo se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-L-ornitina y laminina. Después de 24 horas, se trataron los cultivos con diversas concentraciones del compuesto durante 72 horas. Después los cultivos se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo primario anti-tubulina (TUJ-1) y un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. Se determinó la extensión de las neuritas mediante el uso del algoritmo Enhanced Neurite Outgrowth (ENO) con el Cellomics ArrayScan y se expresó como la longitud media de neurita o la longitud total de neurita por célula.

30 Se prepararon los cultivos de neuronas de médula espinal a partir de embriones de rata de día embrionario 15 (E15) (Sprague-Dawley, Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Los embriones se recogieron y se retiraron sus médula espinales con refrigeración en hielo en tampón salino fosfato (PBS) sin Ca²⁺ ni Mg²⁺. Las piezas diseccionadas de tejido de médula espinal se juntaron y se transfirieron a un medio enzimático de disociación que contenía 20 IU/ml de papaína en una solución salina balanceada de Earle (Worthington Biochemical, Freehold, NJ) y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Después de la disociación enzimática, se aspiró la solución de papaína y el tejido se trituró mecánicamente con una pipeta Pasteur pulida al fuego en un medio completo [Neurobasal Medium con suplemento B-27 (Gibco, Grand Island, NY), 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 3,3 µg/ml de afidicolina, glutamato 0,5 mM] que contenía 2,000 IU/ml de DNasa y 10 mg/ml de inhibidor de la proteasa ovomucoide. Las suspensiones de células individuales en medio completo se sembraron en una placa de 96 pocillos recubierta previamente con poli-L-ornitina/laminina (Becton-Dickinson, Bedford, MA) con una densidad de 1,0 x 10⁴ células/pocillo. Después las neuronas de la médula espinal se mantuvieron expuestas durante 24 horas al vehículo o durante 72 horas a diversas concentraciones el compuesto.

45 Los compuestos de los Ejemplos 1-3 fueron todos activos en los ensayos de neuronas corticales con unos valores de EC₅₀ menores de 1 µM. Los compuestos de los Ejemplos 1 y 6 fueron todos activos en los ensayos de captación dopaminérgica con unos valores de EC₅₀ menores de 1 µM. Los compuestos de los Ejemplos 1-3 y 6 fueron todos activos en los ensayos de neuronas de la médula espinal con unos valores de EC₅₀ menores de 1 µM.

En comparación, CCI-779 y rapamicina se consideraron inactivos en los ensayos de neuronas corticales y en los ensayos de captación dopaminérgica con unos valores de EC₅₀ mayores de 1 µM. La rapamicina feniltriazolindiona fue activa en el ensayo de captación dopaminérgica con un valor de EC₅₀ menor de 1 µM.

Ejemplo 9 - Oclusión Permanente de la Arteria Media Cerebral (pMCAO).

50 Se anestesiaron ratas macho Wistar adultas de 270-300 g (Charles River, Wilmington, MA) con isoflurano al 3% en un 70% de óxido nitroso y 30% de oxígeno a través de un cono nasal. La temperatura se mantuvo a 37 °C durante la cirugía usando una lámpara calentadora. Se indujo una oclusión permanente de la MCAO mediante la electrocauterización de la parte distal de la MCA (mediante una craneotomía) con una ligadura de 90 minutos de ambas arterias carótidas para interrumpir la circulación colateral (Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD (1986) A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. Stroke 17:738-743). El compuesto se administró *in vivo* con una dosis de 10 mg/kg, 1,5, 5,5, 24, 48, y 72 horas después de la isquemia. Las ratas se mantuvieron durante 21 días para la evaluación de la recuperación funcional a largo plazo. Se usaron tres ensayos de comportamiento, modificados a partir de ensayos previos presentados por Bederson et al., (Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H (1986) Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation

of the model and development of a neurologic examination. Stroke 17(3): 472-476) y DeRyck et al. (DeRyck M, van Reempts J, Duytschaever H, van Deuren B, Clincke G (1992) Neocortical localization of tactile/proprioceptive limb placing reactions in the rat. Brain Res 573:44-60), para evaluar la función refleja y sensoriomotora. En resumen, para el ensayo postural, las ratas se suspendieron de la cola aproximadamente 30 cm por encima de la parte superior de la mesa de trabajo. Las ratas que extendieron ambas extremidades hacia la mesa se puntuaron con 0, las que flexionaron la extremidad contralateral hacia el cuerpo y/o las que rotaron el hombro y la extremidad contralateral de forma medial se puntuaron con 1, y las que enrollaron el cuerpo hacia el lado contralateral e intentaron agarrar la cola se puntuaron con 2. El ensayo de colocación de las extremidades anteriores se compone de dos subensayos, los ensayos de ubicación visual y táctil. Para el ensayo de ubicación visual, las ratas se mantuvieron con las extremidades anteriores colgando libremente y se acercaron o bien desde delante o desde un lado a la parte superior de la mesa. Para el ensayo de ubicación táctil, las ratas se mantuvieron de forma que no podían ver la parte superior de la mesa. La superficie lateral y dorsal de la pata tocaba ligeramente en la parte superior de la mesa. Para cada ensayo, las puntuaciones fueron, 0 si la respuesta a la ubicación era inmediata y normal; 1 si la ubicación se retrasaba (>2 segundos) o era ocasional; 2 si no había respuesta. Para el ensayo de colocación de las extremidades posteriores, las ratas se mantuvieron en el borde de la parte superior de la mesa de trabajo y la extremidad inferior contralateral se sacó fuera del borde y se liberó. Las ratas que replegaron la extremidad inferior de vuelta a la parte superior de la mesa de trabajo de forma inmediata se puntuaron con 0, las que se retrasaron (>2 segundos) se puntuaron con 1, y las que no fueron capaces de replegar la extremidad inferior se puntuaron con 2. La puntuación total estaba en el rango de 0 a 12. El compuesto preparado en el Ejemplo 2 mostró una reducción estadísticamente considerable de la puntuación del déficit de comportamiento en las ratas después de la administración *in vivo* (10 mg/kg) a continuación de la pMCAO.

Ejemplo 10 – Ensayos de Células T

En los siguientes ensayos, las células T CD4+ humanas se purificaron mediante selección negativa de linfocitos de sangre periférica usando RosetteSep de acuerdo con las instrucciones del fabricante (StemCell Technologies, Inc. Vancouver, British Columbia).

A. Ensayo de estimulación de anti-CD3 y anti-CD28 y reestimulación de IL-2

Se recubrieron microesferas magnéticas activadas con tosilo (DynaL, Great Neck, NY) con un anticuerpo anti-CD3 ($1 \mu\text{g}/10^7$ microesferas), y un anticuerpo anti-CD28 ($0,5 \mu\text{g}/10^7$ microesferas) según se describe en Blair et al. J. Immunol., 160:12, 1998. Se utilizó una IgG murina para saturar la capacidad de unión de las microesferas (proteína total = $5 \mu\text{g}/10^7$ microesferas). Las microesferas recubiertas de proteína se añadieron a células T CD4+ purificadas (2×10^5 células/ml, relación 1 esfera: 1 célula) y se activaron durante 72 horas en un medio RPMI, suelo de ternera fetal al 10%, glutamina 2 mM. Las células se cosecharon, se lavaron, y se cultivaron durante una noche en un medio recién preparado y se reestimularon con IL-2 como se describe en Bennett et al., J. Immunol. 170:711, 2003. En resumen, las células que reposaron durante toda la noche se contaron de nuevo, se sembraron (10^5 células/pocillo) en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano y se estimularon con 1 ng/ml de IL-2 humana (R&D Systems, Minneapolis, MN) en presencia de concentraciones crecientes de compuesto. 72 horas después de la reestimulación del cultivo, las placas se marcaron con $1 \mu\text{Ci}/\text{pocillo}$ de timidina con tritio y se incubaron durante un período de 6-16 horas.

Los compuestos de los Ejemplos 1 y 3 inhibieron la producción de IL-2 con valores de IC_{50} menores de aproximadamente $1 \mu\text{M}$, y preferentemente menores que aproximadamente 200 nM. La producción de IL-2 de los compuestos de los Ejemplos 1 y 3 estaba en proporción con respecto a la producción de IL-2 de la rapamicina Y CCI-779.

B. Ensayo de activación de ionomicina / 12-miristato 13-acetato de Forbol (PMA)

La proliferación de los compuestos se determinó usando el presente ensayo. Se sembraron células T CD4+ (5×10^5 células/pocillo) en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano con un medio RPMI, suelo de ternera fetal al 10%, glutamina 2 mM, y se estimularon con PMA (10 ng/ml) e ionomicina (200 ng/ml) en presencia de concentraciones crecientes de compuesto. 72 horas después de la activación, se recogieron 100 μl de medio de cultivo para la determinación de IL-2, se añadieron a cada pocillo 100 μl adicionales de un medio recién preparado y los cultivos se marcaron con timidina con tritio ($1 \mu\text{Ci}/\text{pocillo}$) durante seis horas. Los cultivos se recolectaron y se evaluó la incorporación de timidina con tritio (cuentas por minuto, CPM) usando un Trilux (Perkin Elmer, Shelton, CT). La producción de IL-2 se determinó usando un ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN).

En este ensayo, los compuestos de los Ejemplos 1 y 3 inhiben la proliferación con valores de EC_{50} en el intervalo de 4,9-0,2 μM .

Ejemplo 11

El gen supresor del tumor PTEN (homólogos de fosfato y tensina eliminados del cromosoma 10) codifica una fosfatasa lipídica que tiene una importancia crucial en la regulación negativa de las rutas de señalización PI3K/AKT. La mutación o eliminación del gen PTEN se ha encontrado en tumores de cerebro, próstata, endometrio, tiroides,

mama y en tumores linfoides. Véase, Cantley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 4240-4245, 1999; Ali et al., J. Natl. Cancer Inst. 91: 1922-32, 1999; Scott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 7772-7777, 1998; y Nave et al., Biochem. J. 344: 427-431, 1999.

5 En este ensayo, se realizó un ensayo de proliferación basado en células para evaluar los compuestos de la presente invención en la inhibición del crecimiento de células que incluyen la línea celular del tumor de mama MDA468 (PTEN mutado) ATCC N° HTB-132 o la línea celular de tumor de próstata LNCap (PTEN mutado) ATCC CRL-1740.

(i) En el día uno, las células se sembraron placas de cultivo de 96 pocillos.

(ii) En el día dos, los compuestos se añadieron a las células a una concentración predeterminada.

10 (iii) En el día cinco, se midió la proliferación celular mediante un protocolo de ensayo MTS estándar según se describe en SA O'Toole et al., Cancer Detection and Prevention, 27(1), 2003. Los resultados se registraron mediante la absorbancia A490 usando un lector de placas de formato de 96 pocillos.

(iv) Los resultados MTS (unidades de A490) de los pocillos tratados con compuesto se calcularon como el % de crecimiento de control relativo a los pocillos de control (no tratados) en la misma placa de cultivo.

15 Estos datos ilustran que el compuesto del Ejemplo 1 tenía valores de IC₅₀ menores de 0,01 μM tanto para la línea celular MDA468 como para la línea celular LNCap.

Ejemplo 12 - Modulación de la corriente de calcio del receptor de rianodina

Se espera que los compuestos modulen la corriente de calcio del receptor de rianodina a través de la estabilización de la unión FKBP12,6 del receptor de rianodina cuando se ensayen en los siguientes ensayos:

A. Ensayo de Captación de Calcio

20 La captación de calcio (Ca²⁺) se determina mediante los procedimientos que se describen en (1) T. Yamamoto, et al., Cardiovascular Research, 44:146-155 (1999) o (2) M. Yano, et al., Circulation, 102:2131-2136 (2000).

25 Se preparan vesículas del retículo sarcoplasmático (SR) para su uso en los presentes ensayos de acuerdo con el procedimiento de Kranias, et al., Biochem. Biophys. Acta., 709:28-37 (1982). Los ventriculos izquierdos obtenidos de perros con insuficiencia cardíaca inducida se homogeneizan en una solución que contiene Tris-malato 30 mM, sacarosa 0,3 M, 5 mg/l de leupeptina y PMSF 0,1 mM, a pH 7,0 (Solución I). El homogeneizado se centrifuga a 5500 g durante 10 minutos y el sobrenadante resultante se filtra a través de cuatro capas de estopilla antes de centrifugar a 12000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se filtra de nuevo a través de estopilla y se centrifuga a 143000 g durante 30 minutos. El sedimento se suspende de nuevo en una solución que contiene KCl 0,6 M, Tris-malato 30 mM, sacarosa 0,3 M, 5 mg/l de leupeptina, PMSF 0,1 mM, a pH 7,0 (Solución II). La suspensión se centrifuga a 30 143000 g como se ha descrito anteriormente. El sedimento se suspende en la Solución I y se centrifuga a 143000 g. La fracción microsomal sedimentada que contiene las vesículas SR se suspende en una solución que contiene KCl 0,1 M, Tris-malato 20 mM, sacarosa 0,3 M, 5 mg/l de leupeptina, PMSF 0,1 mM, a pH 7,0, para dar una concentración final de proteína de 10-20 mg/ml.

35 (1) Las vesículas SR preparadas anteriormente (0,2 mg/ml) se incuban en 2 ml de una solución que contiene KCl 0,15 M, MgCl₂ 1 mM, ⁴⁵CaCl₂ 30 μM (1 mCi/ml), NaN₃ 10 mM y MOPS 20 mM, a pH 7,1 (22 °C). La captación de Ca²⁺ se inicia mediante la adición de ATP 1 mM y se determina con la variación de intervalos de tiempo mediante la colocación de una alícuota de 2 ml en un filtro de 0,45 μm de Millipore, y aclarándola con 5 ml de tampón de lavado (KCl 0,15 M, MOPS 20 mM, a pH 7,1 (22 °C), que contiene EGTA 30 mM y rojo rutenio 15 μM).

40 La radiactividad retenida en los filtros se determina mediante una cuenta de centelleo en medio líquido.

(2) Las vesículas SR preparadas anteriormente (0,2 mg/ml) se incuban en 0,5 ml de una solución que contiene 0,15 mol/l de gluconato potásico, 1 mmol/l de MgCl₂, 0,2 mmol/l de tampón EGTA-calcio ([Ca²⁺] libre 0,3 μM), NaN₃ 10 mM, y MOPS 20 mM, a PH 6,8. La captación de Ca²⁺ se inicia mediante la adición de ATP 0,5 mM en la cubeta. La captación de Ca²⁺ se monitoriza en el tiempo de manera espectrofotométrica con fluo 3 como 45 indicador de Ca²⁺ (excitación a 480 nm, emisión a 530 nm).

B. Ensayo de Pérdida de Calcio

La captación de calcio (Ca²⁺) se determina mediante los procedimientos descritos en M. Yano, et al., Circulation, 102:2131-2136 (2000).

50 Después de una meseta en la captación de Ca²⁺ en las vesículas SR de acuerdo con el procedimiento descrito en "A. Ensayo de captación de calcio, (2)" indicado anteriormente, se añaden diversas concentraciones de FK506 en presencia de taspigargina 1 μM para inhibir la actividad de SR Ca²⁺-ATP, y se monitorizar la pérdida de Ca²⁺ resultante.

C. Ensayo de Co-Localización

La co-localización del receptor cardiaco de rianodina (RyR) a FKBP12 (o FKBP12,6) se determina mediante los procedimientos descritos en C. George, et al., *Circulation Research*, 93:531-540 (2003).

5 Los cardiomiocitos HL-1 que expresan los receptores 2 de rianodina cardiacos humanos (hRyR2) se cultivan en una matriz de gelatina (0,02% [p/v]/fibronectina (10 µg/ml)) y se mantienen en un medio Claycomb (JRH Biosciences) suplementado con suero de ternera fetal (10% [v/v]), glutamina (2mM), norepinefrina (0,1 mM), penicilina (100u/ml), y estreptomycin (100 µg/ml). La interacción FKBP12,6:hRyR2 se determina usando ensayos de coimmunoprecipitación usando pAb129 (anti-RyR2) y anti-FKBP para inmunoprecipitación e inmunotransferencia, respectivamente.

10 RyR2 se inmunolocaliza usando pAb129 y anticuerpos secundarios conjugados Alexa⁴⁸⁸ y se co-tiñe usando anticuerpos secundarios N-19 (Santa Cruz Biotechnology) y Alexa⁵⁴⁶.

D. Transferencia de Western

La expresión y asociación entre el receptor cardiaco de rianodina (RyR) y FKBP12 (o FKBP12,6) se determina mediante los procedimientos descritos en C. George, et al., *Circulation Research*, 93:531-540 (2003).

15 Las transferencias de Western de fracciones microsomales obtenidas a partir de cardiomiocitos HL-1 cultivados como se ha descrito anteriormente en "C. Ensayo de co-localización" pueden realizarse usando técnicas convencionales. Las fracciones microsomales (100 µg) a partir de células HL-1 se inmunoprecipitan usando anti-RyR2 (pAb129) seguido de inmunotransferencia de anti-FKBP.

E. Determinación Electrofisiológica de la Pérdida de Ca²⁺ de SR

20 La pérdida de Ca²⁺ del retículo sarcoplasmático (SR) se determina mediante los procedimientos descritos en T. Shannon, et. al., *Circ. Res.*, 93: 592-594 (2003).

25 Se aíslan miocitos ventriculares a partir de conejos blancos de Nueva Zelanda (Myrtle's Rabbitry, Inc., Thompson Station, Tenn., USA) en los que se induce insuficiencia cardíaca mediante insuficiencia aórtica combinada y estenosis. El Ca²⁺ de SR diastólico se mide durante la estimulación celular a un estado estacionario a diferentes frecuencias para variar la carga. Los niveles de la pérdida diastólica de Ca²⁺ de receptor de rianodina (RyR) se pueden evaluar mediante el incremento de la carga total de Ca²⁺ del retículo sarcoplasmático ([Ca²⁺]_{SRT}) tras la inclusión de tetracaína (un bloqueante de RyR).

Ejemplo 13 - Efecto cardiovascular

30 La capacidad de los compuestos de la presente invención para tratar o inhibir enfermedades cardiovasculares o enfermedades vasculares periféricas se confirma en un procedimiento de ensayo farmacológico estándar que usa ratones knock out (EKO) ApoE, que es un modelo animal bien aceptado de la aterosclerosis humana. El procedimiento usado se resume brevemente a continuación.

35 Los ratones EKO macho, de 4-6 semanas de edad, se alojan en jaulas de caja de zapatos y se les permite comida y agua a discreción. Los animales se randomizan por peso en cinco grupos (N = 12-15 ratones por grupo) y se alimentan con Purina Rodent Chow durante la primera semana del estudio. También durante este período así como durante las 12 semanas restantes del estudio, los animales se dosifican cada 2 días con 0, 1, 2, 4 o 8 mg/kg de análogo de rapamicina por vía subcutánea (s.c.) usando Tween-80 al 2% y carboximetil celulosa al 1% como vehículo y Control. La dieta del animal se cambia a una dieta Western Diet basada en caseína durante la semana 2 hasta la semana 13 del estudio. Al final del período del estudio, se practica la eutanasia a los animales, se obtienen muestras de plasma, y los corazones se perfunden primero con salino y después con formalina al 10%. Se determinan el colesterol total y los triglicéridos usando métodos enzimáticos con equipos comercialmente disponibles de Boehringer Mannheim y Wako Biochemicals, respectivamente, y el analizador Hitachi 911 de Boehringer Mannheim (Boehringer Mannheim Diagnostic Laboratory Systems, Indianapolis, Ind.). La separación y cuantificación de las lipoproteínas del plasma se realiza utilizando fraccionamiento de tamaño mediante FPLC. En resumen, se filtran 50-100 ml de suero y se inyectan en dos columnas Superose 6 (Amersham Pharmacia Biotech, UK, Ltd) conectadas en serie y se eluye un caudal constante con AEDT sódico 1 mM y NaCl 0,15 M. Las áreas de cada curva que representan VLDL, LDL y HDL se integran utilizando el software Millennium (Waters Technologies Corporation), y cada fracción de las lipoproteínas se cuantifica multiplicando el valor del colesterol total por el porcentaje relativo de área del pico respectivo. Las aortas se aíslan de forma cuidadosa y se mantienen en el fijador de formalina durante 48-72 horas antes de su manipulación. Las lesiones ateroscleróticas se identifican mediante la tinción con Oil Red O, un procedimiento bien aceptado para identificar la acumulación de lípidos neutros tales como colesteroles y triglicéridos. Los vasos se decoloran, y se procesa su imagen usando un microscopio Nikon SMU800 equipado con un sistema de cámara de vídeo Sony 3CCD en conjunto con la utilidad EVIAQ Configuration (National Instrument) como software de captura de imagen. Las lesiones se cuantifican a lo largo del arco aórtico usando un paquete de software de utilidad de umbral hecho a medida y diseñado por Robert Coll (Coleman Technologies). La evaluación automática de la lesión se realiza en los vasos usando la función umbral del programa, de forma

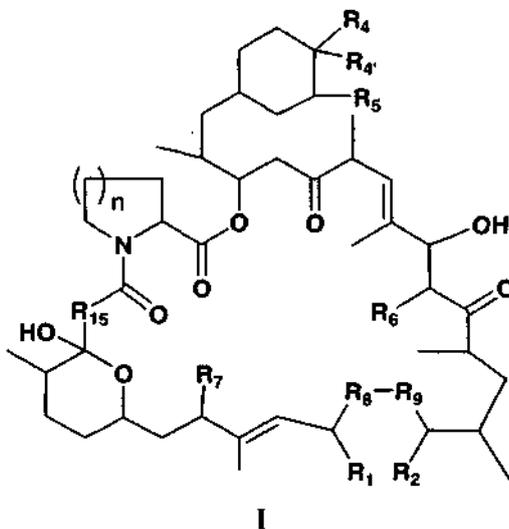
55

5 específica en la región contenida en el arco aórtico desde el extremo proximal de la arteria Carótida Común Derecha hasta el extremo distal de la arteria Subclavia Izquierda. Los datos de aterosclerosis aórtica se expresan como el porcentaje de lesión (lípidos) relacionado estrictamente con esta área luminal definida. La relevancia estadística entre el Control y los grupos tratados se determina usando el Ensayo de Dunnett con un nivel de relevancia del 1% (p menor de 0,01).

10 Se espera que los resultados muestren que el tratamiento con un compuesto de la presente invención aumente de forma significativa (p menor de 0,01) los niveles de HDL colesterol y LDL colesterol circulantes en plasma, mientras que no afecte de forma significativa los niveles de triglicéridos, colesterol total, o VLDL colesterol comparados con los ratones EKO de control. También se espera que los resultados muestren un descenso marcado y drástico en el nivel de aterosclerosis (depósitos de lípidos) en los ratones tratados. También se espera que los resultados muestren que el compuesto de la presente invención protege frente a la acumulación de grasas en la pared vascular, y frente al desarrollo de la enfermedad aterosclerótica descrita de forma clásica.

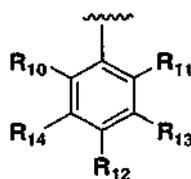
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



en la que:

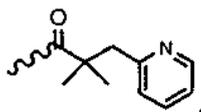
- 5 R₁ y R₂ son grupos diferentes e independientes y se seleccionan entre el grupo que consiste en OR₃ y N(R_{3'})(R_{3''}) o R₁ y R₂ son diferentes y se conectan a través de un enlace sencillo, y se seleccionan entre el grupo que consiste en O y NR₃;
- 10 R₃, R_{3'}, y R_{3''} se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C₁ a C₆, alquilo C₁ a C₆ sustituido, cicloalquilo C₃ a C₈, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, y heteroarilo sustituido
R₄ y R_{4'} son:
- (a) seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, O(alquilo C₁ a C₆), O(alquilo C₁ a C₆ sustituido), O(acilo), O(arilo), O(arilo sustituido), y halógeno; o
(b) tomados juntos para formar un doble enlace con O;
- 15 R₅, R₆, y R₇ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, y OCH₃;
R₈ y R₉ se conectan a través de (i) un enlace sencillo y son CH₂ o (ii) un doble enlace y son CH;
R₁₅ se selecciona entre el grupo que consiste en C=O, CHOH, y CH₂;
n es 1 ó 2;
- 20 en la que los sustituyentes para el alquilo sustituido se seleccionan entre el grupo que consiste en halógeno, CN, OH, NO₂, amino, arilo, heterocíclico, alcoxi, ariloxi, alquilcarbonilo, alquilcarboxi, y ariltio; y en la que los sustituyentes para el arilo sustituido y el heteroarilo sustituido se seleccionan entre el grupo que consiste en halógeno, CN, OH, NO₂, amino, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, alcoxi, ariloxi, alquiloxi, alquilcarbonilo, alquilcarboxi, aminoalquilo, y ariltio;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 25 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichos R₁ y R₂ se conectan a través de un enlace sencillo.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en el que R₁ es O, R₂ es NR₃.
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R₁ es OR₃ y R₂ es N(R_{3'})(NR_{3''}).
5. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que R₃, R_{3'} o R_{3''} son arilo o arilo sustituido.
- 30 6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho arilo sustituido es un anillo de benceno sustituido.
7. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dichos arilo o arilo sustituido son de estructura:



en la que:

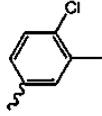
R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , y R_{14} se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C_1 a C_6 , halógeno, acilo, OH, O(alquilo), O(arilo), O(acilo), NH_2 y NH(alquilo),

- 5 8. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que R_8 y R_9 se unen a través de un enlace sencillo.
9. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que R_8 y R_9 se unen a través de un doble enlace.
10. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que R_4 o R_4' es OH.
- 10 11. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que R_4 o R_4' es O(acilo).
12. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho acilo es:

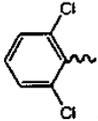


13. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que R_5 , R_6 , y R_7 son OCH_3 .
14. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que n es 2,
- 15 15. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que R_{15} es $C=O$.
16. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado entre el grupo que consiste en 9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-37-fenil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; 9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-37-fenil-4,9,10,12,13,14,15,16,17,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-heneicosahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; 37-(4-cloro-3-metilfenil)-9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; 37-(2,6-diclorofenil)-9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; éster de la 9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-37-fenil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona con ácido -2,2-dimetil-3-(piridin-2-il)-propiónico; y 37-(2,6-diclorofenil)-9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; o sales farmacéuticamente aceptables de cada uno de los mencionados.
17. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en la que R_1 y R_2 se conectan a través de un enlace sencillo; R_1 es O; R_2 es NR_3 ; R_3 es fenilo; R_4 es OH; R_5 - R_7 son OCH_3 ; y R_8 y R_9 son $HC=CH$.
18. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R_1 es OR_3 ; R_2 es $N(R_3')(R_3'')$; R_3 es H; R_3' es H; R_3'' es fenilo; R_4 es OH; R_5 - R_7 son OCH_3 ; y R_8 y R_9 son H_2C-CH_2 .
- 40 19. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R_1 y R_2 se conectan a través de un enlace sencillo; R_1 es O; R_2 es NR_3 ; R_3 es fenilo; R_4 es OH; R_5 - R_7 son OCH_3 ; y R_8 y R_9 son H_2C-CH_2 .
20. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R_1 y R_2 se conectan a través de un enlace sencillo;

R₁ es O; R₂ es NR₃; R₄ es OH; R₅-R₇ son OCH₃; R₈ y R₉ son HC=CH; y R₃ es

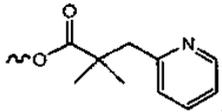


21. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R₁ y R₂ se conectan a través de un enlace sencillo; R₁ es O; R₂ es NR₃; R₄ es OH; R₅-R₇ son OCH₃; R₈ y R₉ son HC=CH; y R₃ es



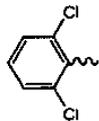
5

22. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R₁ y R₂ se conectan a través de un enlace sencillo; R₁ es O; R₂ es NR₃; R₃ es fenilo; R₅-R₇ son OCH₃; R₈ y R₉ son HC=CH; y R₄ es

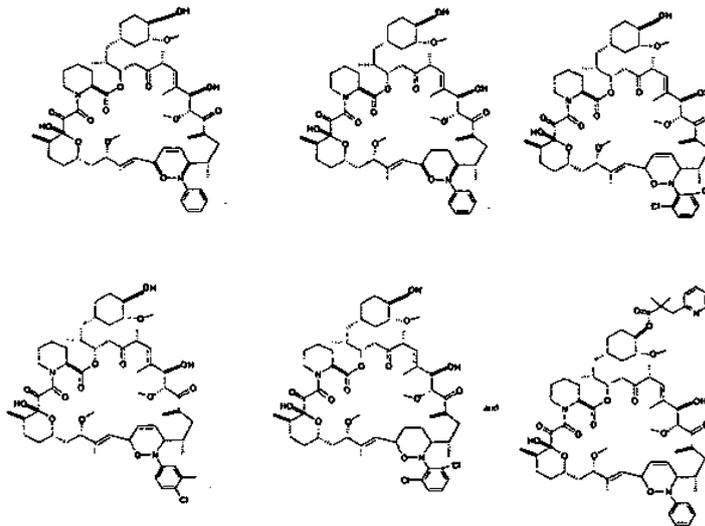


10

23. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R₁ y R₂ se conectan a través de un enlace sencillo; R₁ es O; R₂ es NR₃; R₄ es OH; R₅-R₇ son OCH₃; R₈ y R₉ son H₂C-CH₂; y R₃ es

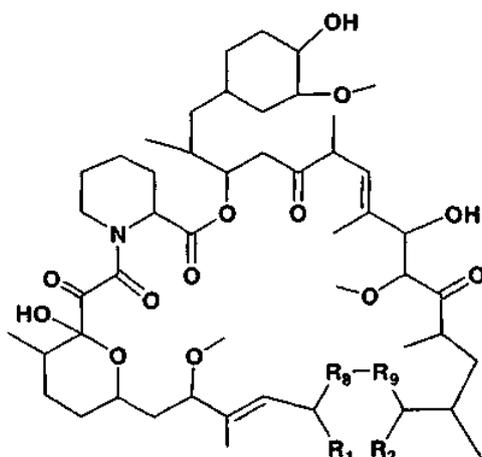


24. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona entre el grupo que consiste en:



15

25. Un compuesto de la reivindicación 1 de fórmula la:



R_1 y R_2 son grupos diferentes e independientes y se seleccionan entre el grupo que consiste en OH y $N(R_{3'})$ ($R_{3''}$); o

R_1 y R_2 son diferentes, se conectan a través de un enlace sencillo, y se seleccionan entre el grupo que consiste en O y NR_3 ;

- 5 $R_{3'}$ y $R_{3''}$ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C_1 a C_6 , alquilo C_1 a C_6 sustituido, cicloalquilo C_3 a C_8 , arilo, arilo sustituido, heteroarilo, y heteroarilo sustituido;

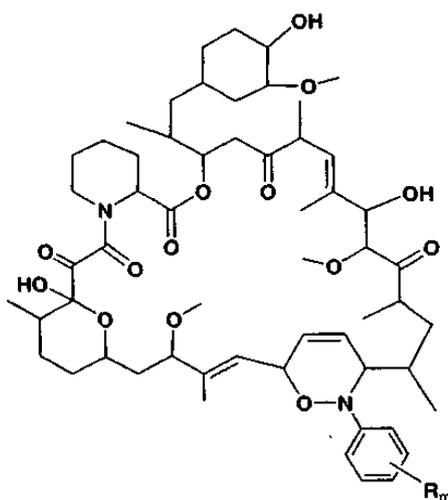
R_8 y R_9 se conectan a través de (i) un enlace sencillo y son CH_2 o (ii) un doble enlace y son CH;

en la que los sustituyentes para el alquilo sustituido se seleccionan entre el grupo que consiste en halógeno, CN, OH, NO_2 , amino, arilo, heterocíclico, alcoxi, ariloxi, alquilcarbonilo, alquilcarboxi, y ariltio; y

- 10 en la que los sustituyentes para el arilo sustituido y el heteroarilo sustituido se seleccionan entre el grupo que consiste en halógeno, CN, OH, NO_2 , amino, alquilo, cicloalquilo, alqueno, alquino, alcoxi, ariloxi, alquilo, alquilcarbonilo, alquilcarboxi, aminoalquilo, y ariltio;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

26. Un compuesto de la reivindicación 25 de fórmula Ib:



- 15 en la que

R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C_1 a C_6 , arilo, halógeno, acilo, OH, O(alquilo), O(arilo), O(acilo), NH_2 y NH (alquilo); y

m es 1 a 5

- 20 27. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 para su uso como un medicamento.

28. El uso de un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos neurológicos.
29. El uso de acuerdo con la reivindicación 28, en la que dicho trastorno neurológico se selecciona entre el grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer; epilepsia; Enfermedad Huntington; Enfermedad de Parkinson; apoplejía; lesión en la médula espinal; lesión cerebral traumática; demencia de cuerpos de Lewy; enfermedad de Pick, enfermedad de Niewmann-Pick; angiopatía amiloide; angiopatía amiloide cerebral; amiloidosis sistémica; hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch; miositis por cuerpos de inclusión; deterioro cognitivo leve; síndrome de Down; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); esclerosis múltiple; distrofia de Duchenne; distrofia muscular de Becker; distrofia muscular facioescapulohumeral (Landouzy-Dejerine); y distrofia muscular cintura-miembro (LGMD).
30. El uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de complicaciones debidas a apoplejía o trauma cerebral en un sujeto con necesidad del mismo o para el tratamiento de trastornos inflamatorios.
31. El uso de acuerdo con la reivindicación 30, en la que dicho trastorno inflamatorio se selecciona entre el grupo que consiste en: lupus, artritis reumatoide, artritis psoriática, osteoartritis, espondilitis anquilosante, psoriasis, dermatitis, escleroderma, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, y colitis ulcerosa.
32. El uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno seleccionado entre el grupo que consiste en: hipertermia maligna; enfermedad del núcleo central; taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica; y displasia del ventrículo derecho arritmogénica de tipo 2 (ARVD-2); en un sujeto con necesidad del mismo, o el tratamiento de un trastorno cardiovascular seleccionado entre el grupo que consiste en: insuficiencia cardíaca congestiva; taquicardia paroxisomal; repolarización precoz; taquicardia ventricular; taquicardia súbita; arritmias inducidas por el ejercicio; síndrome del QT largo; taquicardia bidireccional; trastornos tromboembólicos cardiovasculares arteriales; trastornos tromboembólicos cardiovasculares venosos; trastornos tromboembólicos de las cavidades del corazón; aterosclerosis; reestenosis; enfermedad de las arterias periféricas; cirugía de injerto de derivación coronaria; enfermedad de la arteria carótida; arteritis; miocarditis; inflamación cardiovascular; inflamación vascular; enfermedad cardíaca coronaria (CHD); angina inestable (UA); angina refractaria inestable; angina estable (SA); angina crónica estable; síndrome coronario agudo (ACS); infarto de miocardio primario o recurrente; infarto agudo de miocardio (AMI); infarto de miocardio; infarto de miocardio sin onda Q; infarto de miocardio sin STE; enfermedad arterial coronaria; insuficiencia cardíaca isquémica; isquemia cardíaca; isquemia; muerte súbita por isquemia; ataque isquémico transitorio; apoplejía; enfermedad arterial oclusiva periférica; trombosis venosa; trombosis venosa profunda; tromboflebitis; embolia arterial; trombosis arterial coronaria; trombosis arterial cerebral; embolia cerebral; embolia de riñón; embolia pulmonar; trombosis; arritmia supraventricular; arritmia auricular; aleteo auricular; y fibrilación auricular.
33. Un procedimiento para preparar un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 que comprende las etapas de:
- (i) combinación de rapamicina o un análogo de la misma con un nitrosobenceno opcionalmente sustituido; y
 - (ii) aislamiento del producto de (i).
34. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 33, en el que dicho análogo de rapamicina es norrapamicina, deoxorapamicina, o desmetilrapamicina.
35. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 33 o 34, en el que la etapa (i) se realiza a temperaturas elevadas.
36. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, en el que la etapa (ii) se realiza usando cromatografía.
37. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, para la preparación de un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en 9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-37-fenil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; 9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-37-fenil-4,9,10,12,13,14,15,16,17,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-heneicosahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; 37-(4-cloro-3-metil-fenil)-9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; 37-(2,6-diclorofenil)-9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; éster de la 9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-37-fenil-

5 4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona con ácido -2,2-dimetil-3-(piridin-2-il)-propiónico; y 37-(2,6-diclorofenil)-9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona.

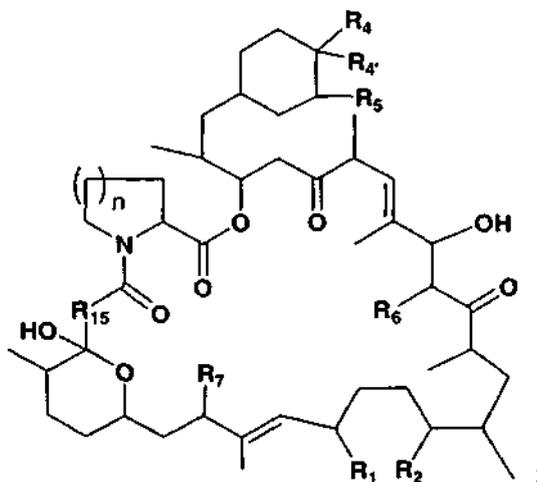
38. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 37, en el que dicho nitrosobenceno opcionalmente sustituido se selecciona entre el grupo que consiste en nitrosobenceno, 2,6-dicloronitrosobenceno, y 1-cloro-2-metil-4-nitrosobenceno.

39. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 38, que comprende adicionalmente:

- 10 (iii) combinación del producto de (ii) con un agente de hidrogenación; y
(iv) aislamiento del producto de (iii).

40. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 39, en el que dicho agente de hidrogenación comprende un catalizador de Pd/C y gas hidrógeno.

41. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 39 o 40, en el que el producto de (iii) es:



15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 42. El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado entre (i) 9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-37-fenil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona y (ii) 37-(4-cloro-3-metilfenil)-9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de una enfermedad neoplásica benigna o maligna en un sujeto con necesidad del mismo.

30 43. El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado entre (i) 9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-37-fenil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona y (ii) 37-(4-cloro-3-metilfenil)-9,27-dihidroxi-3-{2-[4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil}-10,21-dimetoxi-6,8,12,14,20,26-hexametil-4,9,10,12,13,14,15,18,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-nonadecahidro-3H-23,27-epoxi-18,15-(epoxiimino)pirido[2,1-c][1,4]oxazaciclohentriacontin-1,5,11,28,29(6H,31H)-pentaona; en la preparación de un medicamento para el tratamiento de carcinomas y adenocarcinomas.

35 44. El uso de acuerdo con la reivindicación 43, en la que dichos carcinomas o adenocarcinomas son de endometrio, ovario, mama, colon, próstata, pituitaria, meningioma u otros tumores dependientes de hormonas.