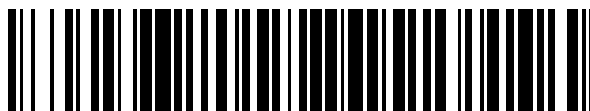


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 530**

51 Int. Cl.:

C07D 498/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2006 E 06710063 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 1856129**

54 Título: **Derivados 39-desmetoxi de rapamicina**

30 Prioridad:

11.03.2005 GB 0504994

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

26.01.2015

73 Titular/es:

**BUCK INSTITUTE FOR RESEARCH ON AGING
(100.0%)
8001 Redwood Boulevard
Novato, CA 94945, US**

72 Inventor/es:

**BECKMANN, CHRISTOPH H.;
MOSS, STEVEN JAMES;
SHERIDAN, ROSE MARY;
ZHANG, MINGQIANG y
WILKINSON, BARRIE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 527 530 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

Derivados 39-desmetoxi de rapamicina

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos derivados 39-desmetoxirrapamicina y a procedimientos para su producción.

También se describe en el presente documento el uso de estos derivados 39-desmetoxirrapamicina en el tratamiento del cáncer y/o de malignidades de las células B, en la inducción o el mantenimiento de la inmunosupresión, en el tratamiento del rechazo de trasplantes, de la enfermedad del injerto contra el huésped, de los trastornos autoinmunes, de las enfermedades inflamatorias, de la enfermedad vascular y de las enfermedades fibróticas, en la estimulación de la regeneración neuronal o en el tratamiento de infecciones fúngicas.

Antecedentes de la invención

La rapamicina (sirolimus) (Figura 1) es un macrólido lipofílico producido por *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 (Sehgal y col., 1975; Vézina y col., 1975; U.S. 3.929.992; U.S. 3.993.749) con un resto 1,2,3-tricarbonilo unido a una lactona de ácido pipercolico (Paiva y col., 1991). Para los fines de esta invención, se describe la rapamicina mediante la convención de numeración de McAlpine y col. (1991) con preferencia con respecto a las convenciones de numeración de Findlay y col. (1980) o Chemical Abstracts (11th Cumulative Index, 1982-1986 p60719CS).

La rapamicina tiene un valor farmacológico significativo debido al amplio espectro de actividades exhibidas por el compuesto. La rapamicina muestra una moderada actividad antifúngica, principalmente frente a especies de *Candida*, pero también frente a hongos filamentosos (Baker y col., 1978; Sehgal y col., 1975; Vézina y col., 1975; U.S. 3.929.992; U.S. 3.993.749). La rapamicina inhibe la proliferación celular dirigiéndose a las rutas de transducción de señal en una variedad de tipos celulares, por ejemplo inhibiendo las rutas de señalización que permiten la progresión de la fase G₁ a la S del ciclo celular (Kuo y col., 1992). En los linfocitos T, la rapamicina inhibe la señalización desde el receptor IL-2 y la posterior autoproliferación de los linfocitos T, para dar lugar a inmunosupresión. Los efectos inhibitorios de la rapamicina no se limitan a los linfocitos T, ya que la rapamicina inhibe la proliferación de muchos tipos de células de mamíferos (Brunn y col., 1996). La rapamicina es, por lo tanto, un potente inmunosupresor con aplicaciones terapéuticas establecidas o predichas en la prevención del rechazo de aloinjerto de órganos y en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Kahan y col., 1991). La 40-O-(2-hidroxi)etilrrapamicina (SDZ RAD, RAD 001, Certican, everolimus) es un análogo semisintético de la rapamicina que muestra efectos farmacológicos inmunosupresores y está también bajo investigación como agente anticanceroso (Sedrani, R. y col., 1998; Kirchner y col., 2000; U.S. 5.665.772, Boulay y col., 2004). Se obtuvo aprobación para este fármaco como inmunosupresor para Europa en 2003. El derivado éster de rapamicina CCI-779 (Wyeth-Ayerst) inhibe el crecimiento celular *in vitro* e inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* (Yu y col., 2001). CCI-779 está actualmente en pruebas clínicas de Fase III como potencial agente anticanceroso. El valor de la rapamicina en el tratamiento de la psoriasis crónica en placas (Kirby y Griffiths, 2001), el uso potencial de efectos tales como la estimulación del crecimiento de las neuritas en células PC12 (Lyons y col., 1994), el bloqueo de las respuestas proliferativas a las citoquinas por las células vasculares y musculares lisas después de una lesión mecánica (Gregory y col., 1993) y su papel en la prevención de la fibrosis de aloinjertos (Waller y Nicholson, 2001) son áreas de intensa investigación (Kahan y Camardo, 2001). Recientes informes revelan que la rapamicina se asocia a una menor incidencia de cáncer en pacientes con aloinjertos de órganos que están bajo terapia inmunosupresora a largo plazo que en aquéllos que siguen otros regímenes inmunosupresores, y que esta reducida incidencia del cáncer se debe a inhibición de la angiogénesis (Guba y col., 2002). Se ha reportado que las actividades neurotróficas de los ligandos de inmunofilina son independientes de su actividad inmunosupresora (Steiner y col., 1997) y que se promueve la estimulación del crecimiento de los nervios por alteración del complejo de los receptores de esteroides maduros, como se señala en la solicitud de patente WO 01/03692. Se han descrito efectos colaterales, tales como hiperlipemia y trombocitopenia, así como potenciales efectos teratogénicos (Hentges y col., 2001; Kahan y Camardo, 2001).

El esqueleto de policétido de la rapamicina es sintetizado por condensación de cabeza a cola de un total de siete unidades de propionato y siete de acetato a una unidad iniciadora de ácido ciclohexanocarboxílico derivada de shikimato por las muy grandes proteínas multifuncionales que constituyen la policétido sintasa de Tipo I (rap PKS, Paiva y col., 1991). El aminoácido derivado de L-lisina, ácido pipercolico, se condensa mediante una unión amida sobre el último acetato del esqueleto de policétido (Paiva y col., 1993), seguido de lactonización para formar el macrociclo.

Las secuencias nucleotídicas para cada uno de los tres genes PKS de rapamicina, el gen codificante de NRPS y las secuencias de los genes tardíos flanqueantes, y los correspondientes polipéptidos, fueron identificados por Aparicio y col., 1996, y Schwecke y col., 1995, y se depositaron en el NCBI bajo el número de acceso X86780, y se han publicado recientemente correcciones para esta secuencia en WO 04/007709.

El primer producto libre de enzima del grupo biosintético de la rapamicina ha sido designado como prerrapamicina (WO 04/007709, Gregory y col., 2004). La producción de la rapamicina totalmente procesada requiere un

procesamiento adicional del núcleo del policétido/NRPS por las enzimas codificadas por los genes tardíos de la rapamicina, RapJ, RapN, RapO, RapM, RapQ y RapI.

5 Se piensa que las acciones farmacológicas de la rapamicina caracterizadas hasta la fecha están mediadas por la interacción con receptores citosólicos denominados FKBP. El principal receptor intracelular de rapamicina en linfocitos T eucarióticos es FKBP12 (DiLella y Craig, 1991) y el complejo resultante interacciona específicamente con proteínas diana para inhibir la cascada de transducción de señal de la célula.

10 Se ha identificado la diana del complejo rapamicina-FKBP12 en levaduras como TOR ("target of rapamycin", diana de la rapamicina) (Alarcón y col., 1999) y la proteína de mamíferos se conoce como FRAP ("FKBP-rapamycin associated protein", proteína asociada a FKBP-rapamicina) o mTOR ("mammalian target of rapamycin", diana en mamíferos de la rapamicina) (Brown y col., 1994).

15 Se ha descrito una conexión entre la señalización mTOR y la síntesis proteica localizada en neuronas; su efecto sobre el estado de fosforilación de las proteínas implicadas en el control de la traducción; la abundancia de componentes de la maquinaria de traducción a los niveles de transcripción y traducción; el control de la actividad permeasa de aminoácidos y la coordinación de la transcripción de muchas enzimas implicadas en rutas metabólicas (Raught y col., 2001). Las rutas de señalización sensibles a la rapamicina también parecen tener un importante papel en el desarrollo del cerebro embrionario, el aprendizaje y la formación de la memoria (Tang y col., 2002). La investigación sobre proteínas TOR en levaduras también reveló sus papeles en la modulación de rutas de señalización sensibles a nutrientes (Hardwick y col., 1999). De forma similar, se ha identificado a mTOR como una diana directa para la acción de la proteína quinasa B (akt) y como poseedora de un papel clave en la señalización de la insulina (Shepherd y col., 1998; Navé y col., 1999). También se ha implicado a la TOR de mamíferos en la polarización del citoesqueleto de actina y la regulación de la iniciación de la traducción (Alarcón y col., 1999). Las fosfatidilinositol 3-quinasas, tales como la mTOR, son funcionales en varios aspectos de la patogénesis de tumores, tales como la progresión del ciclo celular, la adhesión, la supervivencia celular y la angiogénesis (Roymans y Slegers, 2001).

25 Estudios farmacocinéticos de la rapamicina y de análogos de la rapamicina han demostrado la necesidad de desarrollar nuevos compuestos de rapamicina que puedan ser más estables en solución y más resistentes al ataque metabólico, y/o que tengan una mejor permeabilidad a través de la membrana celular y un menor eflujo, y que, por lo tanto, puedan exhibir una mejor biodisponibilidad oral.

30 Se ha indicado un rango de análogos de rapamicina sintetizados usando los sitios químicamente disponibles de la molécula. La descripción de los siguientes compuestos fue adaptada al sistema de numeración de la molécula la rapamicina descrito en la Figura 1. Los sitios químicamente disponibles sobre la molécula para derivatización o sustitución incluyen los grupos hidroxilo C40 y C28 (por ejemplo, U.S. 5.665.772, U.S. 5.362.718), los grupos metoxi C39 y C16 (por ejemplo, WO 96/41807, U.S. 5.728.710) y los grupos ceto C32, C26 y C9 (por ejemplo, U.S. 5.378.836, U.S. 5.138.051, U.S. 5.665.772). La hidrogenación en C17, C19 y/o C21, dirigida al trieno, dio lugar a retención de actividad antifúngica, pero a pérdida relativa de inmunosupresión (por ejemplo, U.S. 5.391.730, U.S. 5.023.262). Se han conseguido por derivatización mejoras significativas en la estabilidad de la molécula (por ejemplo, formación de oximas en C32, C40 y/o C28, U.S. 5.563.145, U.S. 5.446.048), resistencia al ataque metabólico (por ejemplo, U.S. 5.912.253), biodisponibilidad (por ejemplo, U.S. 5.221.670, U.S. 5.955.457, WO 98/04279) y producción de profármacos (por ejemplo, U.S. 6.015.815, U.S. 5.432.183).

40 Sin embargo, sigue necesitándose un mayor rango de derivados de rapamicina con mejor estabilidad metabólica, mejor permeabilidad a través de la membrana celular y/o menor velocidad de eflujo. Dichos derivados de rapamicina tendrían una gran utilidad en el tratamiento de un amplio rango de afecciones. La presente invención proporciona un rango de derivados 39-desmetoxirrapamicina con mejor estabilidad metabólica, mejor permeabilidad a través de la membrana celular y/o menor velocidad de eflujo y/o un perfil inhibitorio celular diferente a la rapamicina. Dichos compuestos son útiles en medicina, en particular para el tratamiento del cáncer y/o de las malignidades de las células B, la inducción o el mantenimiento de la inmunosupresión, el tratamiento del rechazo de trasplantes, de la enfermedad del injerto contra el huésped, de trastornos autoinmunes, de enfermedades inflamatorias, de la enfermedad vascular y de las enfermedades fibrióticas, la estimulación de la regeneración neuronal o el tratamiento de infecciones fúngicas.

50 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona derivados 39-desmetoxi de la rapamicina, procedimientos para la preparación de estos compuestos, intermedios para los mismos y estos compuestos para uso en medicina.

55 Se desvelan en el presente documento derivados 39-desmetoxi de la rapamicina caracterizados por que la posición 40-hidroxi está derivatizada como un éster de ácido carboxílico, como un éter, como un éster fosfato, como un éster fosfinato, como un acetal o como un glicosilo.

Se pueden estudiar la estabilidad metabólica, la permeabilidad a través de la membrana celular, el eflujo y la biodisponibilidad de los compuestos de la invención como se indica a continuación.

5 Cuando se derivatiza la 39-desmetoxirrapamicina como un éster de ácido carboxílico, como un éter o como un acetal, el grupo derivatizador preferiblemente contiene no más de 12 átomos de carbono (especialmente 7 o menos, particularmente 5 o menos, átomos de carbono). Preferiblemente, contiene al menos un grupo funcional (especialmente al menos dos grupos funcionales) seleccionado entre $-\text{CF}_2\text{PO}(\text{OH})_2$, $-\text{PO}(\text{OH})_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ y $-\text{NH}_2$, particularmente seleccionado entre $-\text{COOH}$ y $-\text{OH}$, más particularmente $-\text{OH}$.

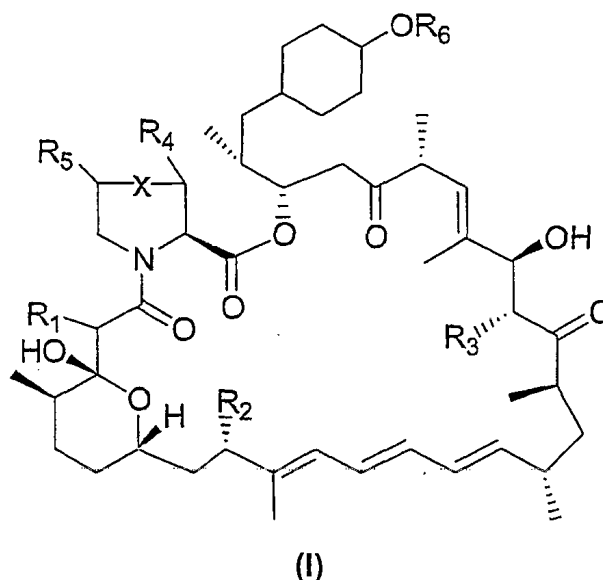
10 Cuando se derivatiza la 39-desmetoxirrapamicina como un acetal derivado de un grupo glicosilo, preferiblemente cada glicosilo se forma a partir de un azúcar o de un glicósido que preferiblemente contiene no más de 12 átomos de carbono (especialmente 7 o menos, particularmente 6 o menos, átomos de carbono). Como ejemplos, se incluyen mono- y disacáridos, particularmente monosacáridos que forman anillos de 5 y 6 miembros. Preferiblemente, contiene al menos un grupo funcional (especialmente al menos dos grupos funcionales) seleccionado entre $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ y $-\text{NH}_2$, particularmente seleccionado entre $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$, más particularmente $-\text{OH}$.

15 Cuando se derivatiza la 39-desmetoxirrapamicina como un éster fosfato, preferiblemente los grupos alquilo contienen no más de 4 átomos de carbono.

15 Cuando se derivatiza la 39-desmetoxirrapamicina como un éster fosfinato, preferiblemente los grupos alquilo contienen no más de 4 átomos de carbono; un ejemplo es el éster formado con ácido fosfínico.

A continuación se dan ejemplos específicos de restos derivatizadores.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona derivados 39-desmetoxirrapamicina según la fórmula (I) siguiente, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos:



20 en la que:

X representa un enlace o CH_2 ;

R_1 representa un grupo ceto o (H,H);

R_2 representa OH u OMe;

R_3 representa H, OH u OMe;

25 R_4 y R_5 representan cada uno independientemente H u OH;

R_6 representa $-\text{R}_7$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}_7$, $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-[\text{CR}_{21}\text{R}_{22}-\text{O}]_a-\text{C}(\text{O})-\text{R}_{23}$; $-\text{CR}_{21}\text{R}_{22}-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{R}_{23}$; $-\text{POR}_{19}\text{R}_{20}$, $-\text{PO}(\text{OR}_{19})(\text{OR}_{20})$ o $\text{Y}-\text{R}_{15}$;

R_7 representa $-(\text{CR}_8\text{R}_9)_m(\text{CR}_{10}\text{R}_{11})_p\text{CR}_{12}\text{R}_{13}\text{R}_{14}$;

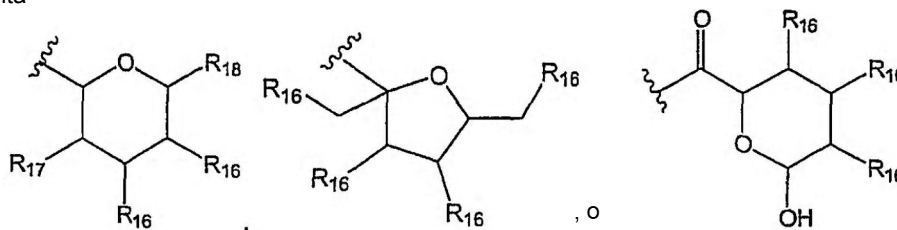
30 R_8 y R_9 representan cada uno independientemente C1-C4 alquilo, C2-C4 alquenilo o C2-C4 alquinilo, pudiendo estar cualquiera de estos grupos opcionalmente substituido con $-\text{PO}(\text{OH})_2$, $-\text{CF}_2\text{PO}(\text{OH})_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$ o $-\text{NH}_2$; o R_8 y R_9 representan cada uno independientemente H, trifluorometilo o F;

R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} y R_{14} representan cada uno independientemente C1-C4 alquilo, C2-C4 alquenilo o C2-C4 alquinilo, pudiendo estar cualquiera de estos grupos opcionalmente substituido con $-\text{PO}(\text{OH})_2$, $-\text{CF}_2\text{PO}(\text{OH})_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$ o $-\text{NH}_2$; o R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} y R_{14} pueden ser independientemente seleccionados entre H,

35 $-(\text{CR}_8\text{R}_9)_q\text{NH}_2$, $-(\text{CR}_8\text{R}_9)_q\text{OH}$, CF_3 , F, COOH ; o R_{10} y R_{11} o R_{12} y R_{13} o R_{13} y R_{14} pueden ser tomados junto con el carbono al que están unidos para formar un C3-C6 cicloalquilo o un anillo de heteroalquilo de 3 a 6 miembros que contiene uno o más heteroátomos seleccionados entre N, O y S y que está opcionalmente substituido con hasta 5 grupos $-(\text{CR}_8\text{R}_9)_c\text{OH}$, $-(\text{CR}_8\text{R}_9)_c\text{NH}_2$ o COOH ;

Y = enlace, $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$, $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$;

R₁₅ representa



los R₁₆ son cada uno independientemente H u OH;

R₁₇ es independientemente seleccionado entre H, OH y NH₂;

R₁₈ es independientemente seleccionado entre H, -CH₃, -CH₂OH y -COOH;

con la condición, sin embargo, de que no más de 2 grupos seleccionados entre R₁₆, R₁₇ y R₁₈ representen H o CH₃;

R₁₉ y R₂₀ representan cada uno independientemente H o C1-C4 alquilo, o R₁₉ y R₂₀ representan juntos =CH₂;

R₂₁ es independientemente seleccionado entre H, CH₃;

R₂₂ es independientemente seleccionado entre H, -CH₃, -CH=CH₂, -CH₂Cl, -CHCl₂, -CCl₃, -CH(OH)Me, -CH₂OH, -CH₂CH₃, -CH(Cl)Me;

R₂₃ es independientemente R₇, Y-R₁₅ o un anillo de arilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con entre uno y tres grupos seleccionados entre OH, F, Cl, Br, NO₂ y NH₂; a representa 0 o 1;

m, p y q representan cada uno independientemente un número entero de 0-4;

con la condición, sin embargo, de que el resto R₇ no contenga más de 12 átomos de carbono y sí contenga al menos un grupo funcional seleccionado entre -PO(OH)₂, -CF₂PO(OH)₂, -COOH, OH o NH₂; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

La estructura anterior muestra un tautómero representativo, y la invención cubre todos los tautómeros de los compuestos de fórmula (I), por ejemplo compuestos ceto, donde se ilustran compuestos enol, y viceversa.

A menos que se indiquen específicamente estereoisómeros particulares (por ejemplo, mediante un enlace en negrilla o en línea discontinua en un estereocentro relevante en una fórmula estructural, por representación de un doble enlace como con configuración E o Z en una fórmula estructural o usando nomenclatura de designación de la estereoquímica), todos los estereoisómeros quedan incluidos en el alcance de la invención como compuestos puros, así como mezclas de los mismos. A menos que se indique algo diferente, los enantiómeros individuales, diastereómeros, isómeros geométricos y sus combinaciones y mezclas quedan todos amparados por la presente invención. Las formas cristalinas polimórficas y los solvatos e hidratos quedan también amparados dentro del alcance de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona derivados 39-desmetoxirrapamicina tales como compuestos de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso como producto farmacéutico.

Definiciones

Los artículos "un" y "una" son usados en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo "un análogo" significa un análogo o más de un análogo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "análogo(s)" se refiere a compuestos químicos que son estructuralmente similares a otro, pero que difieren ligeramente en cuanto a composición (como en la sustitución de un átomo por otro o en la presencia o ausencia de un grupo funcional particular).

En particular, el término "análogo de 39-desmetoxirrapamicina" se refiere a un compuesto de 39-desmetoxirrapamicina producido mediante los procedimientos de WO 2004/007709 y/o como se muestra mediante la fórmula (II). También se hace referencia a estos compuestos como "compuestos parentales" y estos términos son utilizados indistintamente en la presente solicitud. En la presente solicitud, el término "análogo de 39-desmetoxirrapamicina" incluye referencia a la propia 39-desmetoxirrapamicina.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "derivado(s)" se refiere a compuestos químicos que han sido modificados con respecto a su compuesto parental por química orgánica semisintética.

En particular, el término "derivado de 39-desmetoxirrapamicina" se refiere a un derivado de 39-desmetoxirrapamicina según la fórmula (I) anterior, o a una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, producido por alteración semisintética de un análogo de 39-desmetoxirrapamicina. También se hace referencia a estos compuestos como "compuestos de la invención" o "derivados 39-desmetoxi de rapamicina", y estos términos son utilizados indistintamente en la presente solicitud.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**trastorno(s) autoinmune(s)**" incluye, sin limitación: lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide, miastenia gravis y esclerosis múltiple.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**enfermedades inflamatorias**" incluye, sin limitación: psoriasis, dermatitis, eczema, seborrea, enfermedad inflamatoria del intestino (incluyendo, aunque sin limitación, la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn), inflamación pulmonar (incluyendo el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el enfisema, el síndrome del distrés respiratorio agudo y la bronquitis), artritis reumatoide y uveítis ocular.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**cáncer**" se refiere a un crecimiento maligno de células en la piel o en los órganos corporales, por ejemplo, aunque sin limitación, en la mama, en la próstata, en el pulmón, en el riñón, en el páncreas, en el estómago o en el intestino. Un cáncer tiende a infiltrarse en el tejido adyacente y a diseminarse (metastatizar) hacia órganos distantes, por ejemplo hacia el hueso, el hígado, el pulmón o el cerebro.
 15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término cáncer incluye tipos de células tumorales metastáticas, tales como, aunque sin limitación, melanoma, linfoma, leucemia, fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y mastocitoma y tipos de carcinoma de tejidos, tales como, aunque sin limitación, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer gástrico, glioblastoma, cáncer hepático primario y cáncer de ovario.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**malignidades de las células B**" incluye un grupo de trastornos que incluyen la leucemia linfocítica crónica (LLC), el mieloma múltiple y el linfoma no Hodgkin (LNH). Se trata de enfermedades neoplásicas de la sangre y de los órganos formadores de sangre. Causan disfunción de la médula ósea y del sistema inmunitario, lo que hace al hospedador altamente susceptible a la infección y a la hemorragia.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "enfermedad vascular" incluye, sin limitación: trastornos vasculares hiperproliferativos (por ejemplo, reestenosis y oclusión vascular), aterosclerosis vascular de injerto, enfermedad cardiovascular, enfermedad vascular cerebral y enfermedad vascular periférica (por ejemplo, enfermedad de las arterias coronarias, arteriosclerosis, aterosclerosis, arteriosclerosis no ateromatosa o lesión de la pared vascular).

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "regeneración neuronal" se refiere a la estimulación del crecimiento de las células neuronales e incluye el crecimiento de las neuritas y la recuperación funcional de las células neuronales. Como enfermedades y trastornos en los que la regeneración neuronal puede tener un beneficio terapéutico significativo, se incluyen, aunque sin limitación, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la corea de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, la neuralgia del trigémino, la neuralgia glossofaríngea, la parálisis de Bell, la distrofia muscular, el accidente cerebrovascular, la atrofia muscular progresiva, la atrofia muscular heredada bulbar progresiva, la espondilosis cervical, el síndrome de Gullain-Barre, la demencia, las neuropatías periféricas y la lesión de nervios periféricos, ya estén causados por lesión física (por ejemplo, lesión
 35 o traumatismo de la médula espinal, lesión o daño del nervio ciático o facial) o por un estado de enfermedad (por ejemplo, diabetes).

40 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**enfermedades fibríóticas**" se refiere a enfermedades asociadas a la excesiva producción de la matriz extracelular, e incluye (sin limitación) sarcoidosis, queloides, glomerulonefritis, enfermedad renal en fase terminal, fibrosis hepática (incluyendo, aunque sin limitación, cirrosis, enfermedad hepática debida al alcohol y esteatohepatitis), nefropatía de injerto crónica, adherencias quirúrgicas, vasculopatía, fibrosis cardíaca, fibrosis pulmonar (incluyendo, aunque sin limitación, la fibrosis pulmonar idiopática y la alveolitis fibrosante criptogénica), degeneración macular, retinopatía retiniana y vítrea y fibrosis inducida por quimioterapia o radiación.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**enfermedad del injerto contra el huésped**" se refiere a una complicación que se observa tras un trasplante alogénico de células madre/médula ósea. Se produce cuando las células que luchan contra la infección del donante reconocen el cuerpo del paciente como diferente o extraño. Estas células que luchan contra la infección atacan entonces los tejidos en el cuerpo del paciente del mismo modo que si estuvieran luchando contra una infección. La enfermedad del injerto contra el huésped está categorizada como aguda cuando se produce en los primeros 100 días después del trasplante y como crónica si se produce más
 50 de 100 días después del trasplante. Los tejidos típicamente implicados incluyen el hígado, el tracto gastrointestinal y la piel. La enfermedad del injerto contra el huésped crónica se produce en aproximadamente un 10-40 por ciento de los pacientes después de un trasplante de células madre/médula ósea.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "**biodisponibilidad**" se refiere al grado o a la velocidad a la que un fármaco u otra sustancia se absorbe o se vuelve disponible en el sitio de actividad biológica tras su administración. Esta propiedad depende de una serie de factores, incluyendo la solubilidad del compuesto, la velocidad de absorción en el intestino, el grado de unión a proteínas y el metabolismo, etc. Se describen en el presente documento diversas pruebas de biodisponibilidad que le resultarían familiares a un experto en la técnica (véase también Trepanier y col., 1998, Gallant-Haidner y col., 2000).

El término "**solubilidad en agua**", tal como se utiliza en la presente solicitud, se refiere a la solubilidad en medios acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfatos (PBS) a pH 7,4.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, tales como los compuestos de fórmula (I), incluyen sales convencionales formadas a partir de ácidos o bases inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, así como sales de adición de ácido de amonio cuaternario. Como ejemplos más específicos de sales de ácido adecuadas, se incluyen las de clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, perclórico, fumárico, acético, propiónico, succínico, glicólico, fórmico, láctico, maleico, tartárico, cítrico, palmoico, malónico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, fumárico, toluensulfónico, metanosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico, hidroxinaftoico, yodhídrico, málico, esteroico, tánico y similares. Otros ácidos, tales como el oxálico, aun no siendo en sí mismos farmacéuticamente aceptables, pueden ser útiles en la preparación de sales útiles como intermediarios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables. Como ejemplos más específicos de sales básicas adecuadas, se incluyen las sales de sodio, litio, potasio, magnesio, aluminio, calcio, zinc, N,N'-dibenciletildiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, N-metilglucamina y procaína. Las referencias que se hacen más adelante en el presente documento a un compuesto según la invención incluyen tanto los compuestos de fórmula (I) como sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los grupos alquilo, alqueno y alquino pueden ser de cadena lineal o ramificados.

Como ejemplos de grupos alquilo C1-C4, se incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo y n-butilo.

Como ejemplos de grupos alqueno C2-C4, se incluyen etenilo y 2-propenilo.

Como ejemplos de grupos alquino C2-4, se incluye etinilo.

Grupos cicloalquilo C3-C6 se refiere a un anillo de cicloalquilo que incluye 3-6 átomos de carbono y que puede estar opcionalmente ramificado. Como ejemplos, se incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, metilciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

Los anillos de heteroalquilo de 3 a 6 miembros que contienen uno o más heteroátomos seleccionados entre N, O y S incluyen anillos que contienen uno o dos heteroátomos, especialmente un heteroátomo. Como ejemplos, se incluyen furano, pirano, oxetano, oxirano, piperidina, pirrolidina, azetidina, aziridina, tiirano, tietano, tiofeno, tiopirano y morfolina.

Como ejemplos de sustituyentes eventuales para los anillos de heteroalquilo de 3 a 6 miembros, se incluyen -OH, -CH₂OH, NH₂, CH₂NH₂ y COOH. Típicamente, los anillos de heteroalquilo de 3 a 6 miembros pueden estar sin substituir o substituidos por 1 o 2, por ejemplo 1, sustituyentes.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona derivados 39-desmetoxirrapamicina, como se ha indicado anteriormente, procedimientos para la preparación de estos compuestos, intermediarios de los mismos y estos compuestos para uso en medicina.

Preferiblemente, R₇ contiene 7 o menos, especialmente 5 o menos, átomos de carbono.

R₇ preferiblemente contiene al menos un grupo funcional seleccionado entre -PO(OH)₂, -OH, -COOH y -NH₂, more preferiblemente -OH, -COOH o -NH₂, especialmente -COOH y OH, más especialmente OH. Preferiblemente, R₇ contiene 2 o más substituyentes, por ejemplo, 2 grupos -OH.

Adecuadamente, X representa CH₂;

Adecuadamente, a representa 0.

Adecuadamente, p representa 0 o 1.

Adecuadamente, m representa 0 o 1.

Adecuadamente, q representa 0, 1 o 2.

Adecuadamente, R₁₁ representa H. Adecuadamente R₁₂ representa H.

Adecuadamente, R₁₃ representa H u OH.

Cuando p representa 1, adecuadamente R₁₀ representa Me, OH o CH₂OH.

Cuando p representa 1, adecuadamente R₁₁ representa Me, H o CH₂OH.

Cuando m y p representan ambos 0, adecuadamente R₁₂ y R₁₃ representan ambos H, y R₁₄ representa -(CR₈R₉)_q-OH, donde q = 0 o 1 y R₈ y R₉ representan ambos H.

Cuando p representa 1 y m representa 0, adecuadamente R_{10} y R_{11} representan ambos H, R_{12} representa H, R_{13} representa H, OH o NH_2 y R_{14} representa $-(CR_8R_9)_q-OH$, donde $q = 0$ o 1 y R_8 y R_9 representan ambos H.

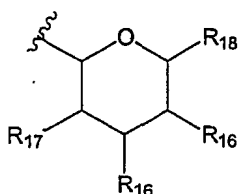
Cuando R_6 representa $-POR_{15}R_{16}$, adecuadamente R_{15} y R_{16} representan ambos CH_3 o representan ambos CH_2CH_3 .

5 Adecuadamente, R_6 representa el residuo derivado de la formación de un éster con ácido hidroxilacético, ácido 3-hidroxi-2,2-dimetilpropiónico, ácido 2,3-dihidroxi-2,2-dimetilpropiónico, ácido 3-hidroxi-2-hidroximetilpropiónico o ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico.

En un conjunto de ejemplos de compuestos, R_6 representa $C(O)R_7$.

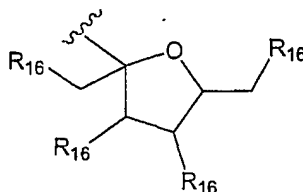
10 Preferiblemente, R_7 es el resto formado por condensación del alcohol macrocíclico con un ácido seleccionado entre la lista consistente en ácido hidroxilacético, ácido 3-hidroxi-2,2-dimetilpropiónico, ácido 2,3-dihidroxi-2,2-dimetilpropiónico, ácido 3-hidroxi-2-hidroximetilpropiónico y ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico, especialmente ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico.

Cuando R_{15} representa:



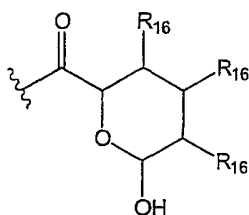
15 como ejemplos de este resto se incluye el resto formado por formación de un acetal con (i) glucosa (es decir, R_{18} representa CH_2OH y cada R_{16} y R_{17} representa OH), por ejemplo, D-glucosa; (ii) glucosamina (es decir, R_{18} representa CH_2OH , cada R_{16} representa OH y R_{17} representa NH_2), por ejemplo, D-glucosamina; (iii) ácido glucurónico (es decir, R_{18} representa $COOH$ y cada R_{16} y R_{17} representa OH), por ejemplo, ácido D-glucurónico, y (iv) arabinosa (es decir, R_{18} representa H y cada R_{16} y R_{17} representa OH), por ejemplo, D-arabinosa.

Cuando R_{15} representa:



20 como ejemplos de este resto se incluye el resto formado por formación de un acetal con fructosa (es decir, cada R_{16} representa OH), por ejemplo, el residuo de D-fructosa.

Cuando R_{15} representa:

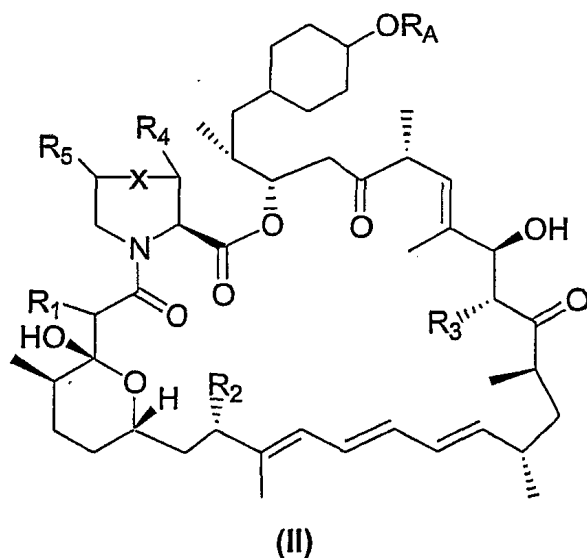


25 como ejemplos de este resto se incluye el resto formado por formación de un éster con ácido glucurónico (es decir, cada R_{16} representa OH), por ejemplo, el residuo de ácido D-glucurónico.

En general, los compuestos de la invención son preparados por derivatización semisintética de un análogo de 39-desmetoxirrapamicina de fórmula (II).

30 Por lo tanto, un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo comprende:

(a) hacer reaccionar un análogo de 39-desmetoxirrapamicina de fórmula (II):



en la que R_A representa H o $(CH_2)_2-OH$
o un derivado protegido del mismo, con un compuesto de fórmula (III):



- 5 o un derivado activado de R_6 ;
 (b) convertir un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo en otro compuesto de fórmula (I) u otra sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o
 (c) desproteger un compuesto protegido de fórmula (I).

10 El término "derivado activado", tal como se ha usado anteriormente, se refiere a (por ejemplo, aunque sin limitación):
 en el caso de ésteres - ácidos carboxílicos, haluros de acilo, anhídridos mixtos, anhídridos simétricos o ésteres carboxílicos; en el caso de éteres - haluros de alquilo, mesilatos de alquilo, triflatos de alquilo, tosilatos de alquilo u otros derivados de alquilo adecuadamente activados; en el caso de fosfatos y fosfonatos - clorofosfatos, cianofosfatos de dialquilo, dialquifosforamidatos o clorofosfitos de dialquilo; o en el caso de acetales derivados de grupos glicosilo - utilizando un donador de glicosilo, por ejemplo, haluros de glicosilo, tioglicósidos, 1-O-acilglicósidos, orto-ésteres, 1-O o 1-S carbonatos, tricloroimidatos, 4-pentenilglicósidos, ésteres fosfato de glicosilo,
 15 1-O-sulfonilos o glicósidos 1-O-sililados.

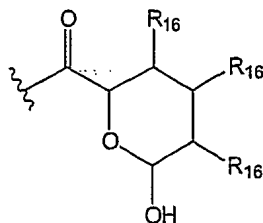
En el procedimiento (a), se pueden preparar análogos de 39-desmetoxirrapamicina de fórmula (II) como se describe en WO 2004/007709 y como además se indica en los ejemplos del presente documento.

20 Además de los procedimientos específicos y de las referencias que se proporcionan en el presente documento, un experto en la técnica puede también consultar referencias de libros de texto estándar para procedimientos sintéticos, incluyendo, aunque sin limitación, el libro de texto de Vogel de química orgánica práctica (Furniss y col., 1989) y la química orgánica avanzada de March (Smith y March, 2001).

25 Adicionalmente, se pueden proteger los grupos hidroxilo presentes mediante una de las muchas estrategias de protección de hidroxilo estándar disponibles para un experto en la técnica. Los grupos hidroxilo pueden ser protegidos formando éteres, incluyendo, aunque sin limitación, éteres alquílicos substituidos, éteres bencílicos substituidos y éteres silílicos. Preferiblemente, se forma un éter silílico, incluyendo, aunque sin limitación, éter trimetilsilílico, trietilsilílico, t-butildimetilsilílico y t-butildifenilsilílico, por reacción de una forma activada del silano (incluyendo, aunque sin limitación, cloruro de sililo o triflato de sililo) con 39-desmetoxirrapamicina en presencia de una base adecuada. Se podría eliminar entonces el grupo protector por hidrólisis ácida o por escisión asistida por fluoruro. Los
 30 1,2-dioles pueden ser protegidos como acetónidos, en base a la condensación de un derivado de acetona. Éste puede ser eliminado por catálisis ácida.

Los análogos de 39-desmetoxirrapamicina de fórmula (II) pueden ser usados como plantillas para posterior semisíntesis (es decir, procedimiento (a)). El grupo hidroxilo pendiente en C-40 puede ser funcionalizado, por ejemplo, por acilación, alquilación, glicosilación o fosforilación a través de una serie de transformaciones sintéticas
 35 conocidas para un experto en la técnica.

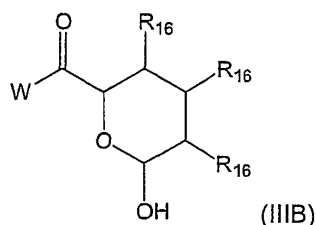
En el procedimiento (a), cuando R₆ representa un resto de fórmula -C(O)R₇ o Y-R₁₅ en la que R₁₅ representa



5 e Y = enlace, la formación de un hidroxíéster, u O-acilación, puede estar mediada por reacción del grupo hidroxilo de los compuestos de fórmula (II) con un ácido carboxílico correspondiente, preferiblemente en forma activada, por ejemplo un compuesto de fórmula (III Ai) o (III Aii):



o con un compuesto de fórmula (III B):

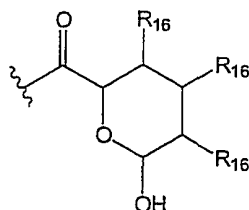


10 en la que W es un grupo que activa un ácido carboxílico para el ataque nucleofílico. Los ácidos carboxílicos pueden ser activados por formación de, por ejemplo, aunque sin limitación, haluros de acilo (por ejemplo, W = Cl), anhídridos mixtos (es decir, W = OC(O)R'), anhídridos simétricos (W = OC(O)R₇) o ésteres carboxílicos (es decir, W = OR').

15 Los compuestos de fórmula (III Ai), (III Aii) o (III B) pueden ser preparados a partir de sus ácidos carboxílicos comercialmente disponibles usando procedimientos estándar conocidos para un experto en la técnica, y, en un aspecto específico, se pueden preparar compuestos según la fórmula (III Ai) en la que R₇ es -(CR₈R₉)_m(CR₁₀R₁₁)_pCR₁₂R₁₃R₁₄ usando procedimientos como los descritos en US 5.362.718, US 5.665.772 o EP 0.663.916.

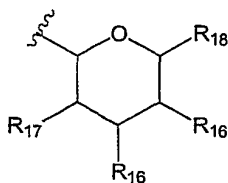
20 Preferiblemente, un análogo de 39-desmetoxirrapamicina reacciona en medio orgánico con un cloruro de ácido o un anhídrido mixto en presencia de una base. Como bases que pueden ser utilizadas, se incluyen, aunque sin limitación, piridina, 4,4-dimetilaminopiridina (DMAP), 2,6-lutideno, 2,6-di-*tert*-butilpiridina, trietilamina, diisopropilamina, otras trialkilaminas, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) o 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno (DBN). En ejemplos específicos descritos en el presente documento, la 39-desmetoxirrapamicina reacciona con un anhídrido mixto en presencia de DMAP.

En el procedimiento (a), cuando R₆ representa un resto de fórmula -C(O)R₇ o Y-R₁₅ en la que R₁₅ representa

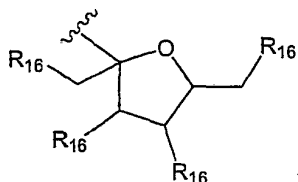


25 e Y = -C(O)O- o -(CH₂)₂-OC(O)O-. la formación de estos hidroxíésteres requiere la reacción del grupo hidroxilo de los compuestos de fórmula (II) o un compuesto que es 40-O-(hidroxietil)-fórmula II con un reactivo que formará un carbonato activado, tal como un compuesto de fórmula IV

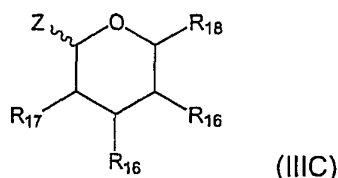
En el procedimiento (a), cuando R₁₅ representa un resto de fórmula



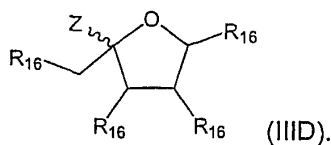
o



- 5 la formación de una unión glicosídica, u O-glicosilación, puede estar mediada por reacción del grupo hidroxilo con un donador de glicosilo correspondiente, preferiblemente en forma activada (véase Toshima y Tatsuta (1993)), por ejemplo un compuesto de fórmula (IIIC):



o un compuesto de fórmula (IIID):

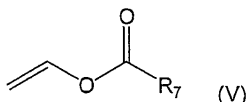


- 10 Usando un 'donador de glicosilo', incluyendo, aunque sin limitación, haluros de glicosilo (Z = F, Cl, Br), tioglicósidos (Z = SMe, Set, SPh, SPy, SCN), 1-O-acilglicósidos (Z = OC(O)R), orto-ésteres (Z = OC(Me)(R)(O-C2 de fórmula (IIIC/IIID)), 1-O o 1-S carbonatos (Z = OC(S)SMe, Z = OC(O)imidazol, Z = OC(S)imidazol, Z = SC(S)OEt), tricloroimidatos (Z = OC(=NH)CCl₃), 4-pentenilglicósidos (Z = OCH₂CH₂CH₂CH=CH₂), ésteres fosfato (por ejemplo, Z = OP(O)(OPh)₂), 1-O-sulfonilos (Z = tosilo) o glicósidos 1-O-sililados (Z = OTMS o OTBS), se puede glicosilar el análogo de 39-desmetoxirrapamicina en medio orgánico, preferentemente en presencia de un activador (tal como un ácido de Lewis o una sal de metal pesado, véase Toshima y Tatsuta, 1993)). El donador de glicosilo específico utilizado y las condiciones de reacción determinarán si se forma un alfa- o beta-glicósido. Como antes para la acilación, cualquier grupo hidroxilo presente en el compuesto parental puede ser protegido o enmascarado, de tal forma que la utilización de un equivalente de donador de glicosilo dará lugar a 40-O-acilación. El resto de los hidroxilos en el donador de glicosilo deberían ser protegidos como, por ejemplo, O-acetatos, O-benzoatos o 1,2-acetonidos, por lo que será necesaria otra desprotección. Además, se pueden usar donadores de 2-desoxiglicosilo, tales como glicales (también se requiere una etapa reductora), para preparar glicósidos de 2'-desoxi-39-desmetoxirrapamicina, y se pueden usar donadores de 2,6-didesoxiglicosilo, tales como 2,6-anhidro-2-tioazúcares, para preparar glicósidos de 2',6'-didesoxi-39-desmetoxirrapamicina.

- En el procedimiento (b), la formación de sales y el intercambio pueden ser llevados a cabo por procedimientos convencionales conocidos para un experto en la técnica. Se pueden realizar interconversiones de compuestos de fórmula (I) por procedimientos conocidos; por ejemplo, se pueden interconvertir grupos hidroxilo y ceto por oxidación/reducción como se describe en algún otro lugar del presente documento. Se pueden preparar compuestos de fórmula (I) en la que R₆ representa -PO(OH)₂ por fosforilación de un correspondiente compuesto de fórmula (I) en la que R₆ representa OH. Se facilitan las condiciones adecuadas en algún otro lugar del presente documento.

- En los procedimientos (a) y (c), se pueden encontrar ejemplos de grupos protectores y los medios para su eliminación en T W Greene "Protective Groups in Organic Synthesis" (J Wiley and Sons, 1991). Como grupos protectores de hidroxilo adecuados, se incluyen alquilo (por ejemplo, metilo), acetal (por ejemplo, acetónido) y acilo (por ejemplo, acetilo o benzoilo), que pueden ser eliminados por hidrólisis, y arilalquilo (por ejemplo, bencilo), que puede ser eliminado por hidrólisis catalítica, o éter silílico, que puede ser eliminado por hidrólisis ácida o escisión asistida con iones fluoruro.

Además del procedimiento (a), los análogos de 39-desmetoxirrapamicina de fórmula (I) en la que R_6 representa R_7 pueden ser sintetizados por transesterificación catalizada por lipasa. Por ejemplo, aunque sin limitación, un análogo de 39-desmetoxirrapamicina de fórmula (II) puede reaccionar con un éster de vinilo de fórmula (V) en presencia de lipasa PS-C "Amano" II en las condiciones de reacción descritas por Gu y col. (2005) y como además se indica en los ejemplos en el presente documento. Esta metodología no se limita al uso de ésteres de vinilo y la transesterificación puede ser catalizada por otras lipasas o esterasas.



Otros compuestos de la invención pueden ser preparados por procedimientos conocidos per se o por procedimientos análogos a los anteriormente descritos.

Los nuevos derivados 39-desmetoxirrapamicina son útiles directamente y como plantillas para posterior semisíntesis o bioconversión, para producir compuestos útiles como inmunosupresores, agentes antifúngicos, agentes anticancerosos, agentes antiinflamatorios, agentes neuroregenerativos o agentes para el tratamiento del rechazo de trasplantes, de la enfermedad del injerto contra el huésped, de trastornos autoinmunes, de la enfermedad vascular y/o de enfermedades fibróticas. Los métodos para la derivatización semisintética de la rapamicina y sus análogos son bien conocidos en la técnica e incluyen (aunque sin limitación) las modificaciones descritas en, por ejemplo, U.S. 5.665.772, U.S. 5.362.718, WO 96/41807, U.S. 5.728.710, U.S. 5.378.836, U.S. 5.138.051, U.S. 5.665.772, U.S. 5.391.730, U.S. 5.023.262, U.S. 5.563.145, U.S. 5.446.048, U.S. 5.912.253, U.S. 5.221.670, U.S. 5.955.457, WO 98/04279, U.S. 6.015.815 y U.S. 5.432.183.

Las anteriores estructuras de intermediarios (por ejemplo, compuestos de fórmula (II)) pueden ser sometidas a tautomerización, y, cuando se ilustra un tautómero representativo, se entenderá que se quiere hacer referencia a todos los tautómeros, por ejemplo compuestos ceto donde se ilustran compuestos enol y viceversa.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de los derivados 39-desmetoxirrapamicina de la invención en medicina. En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de derivados 39-desmetoxirrapamicina de la invención en la preparación de un medicamento para la inducción o el mantenimiento de la inmunosupresión, la estimulación de la regeneración neuronal o el tratamiento del cáncer, de las malignidades de las células B, de las infecciones fúngicas, del rechazo de trasplantes, de la enfermedad del injerto contra el huésped, de trastornos autoinmunes, de enfermedades inflamatorias, de la enfermedad vascular y de enfermedades fibróticas, o de agentes para uso en la regulación de la cicatrización de heridas.

La resistencia a múltiples fármacos (RMF) es un problema significativo en el tratamiento del cáncer y de las malignidades de las células B. Es la razón principal que se oculta tras el desarrollo de la resistencia a fármacos en muchos cánceres (Persidis A, 1999). La RMF se asocia a un mayor nivel de transportadores del casete de unión al trifosfato de adenosina (transportadores ABC), en particular a un aumento en la expresión del gen *MDR1* que codifica la P-glicoproteína (P-gp) o del gen *MRP1* que codifica MRP1. El nivel de expresión del gen *MDR1* varía ampliamente a través de diferentes líneas celulares derivadas de cáncer; en algunas líneas celulares, es indetectable, mientras que en otras puede mostrar una expresión hasta 10 o 100 veces mayor en relación a controles estándar.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención proporciona el uso de un derivado 39-desmetoxirrapamicina de la invención en el tratamiento de cánceres o malignidades de células B RMF. En un aspecto específico, la presente invención proporciona el uso de derivados 39-desmetoxirrapamicina en el tratamiento de cánceres o malignidades de células B que expresan P-gp. En una realización aún más preferida, la presente invención proporciona el uso de un derivado 39-desmetoxirrapamicina de la invención en el tratamiento de cánceres o malignidades de células B que tienen una alta expresión de P-gp. En particular, los cánceres o malignidades de células B que tienen una alta expresión de P-gp pueden tener una expresión 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces o 100 veces mayor en relación a los niveles de control. Son controles adecuados las células que no expresan P-gp, que tienen un bajo nivel de expresión de P-gp o que tienen una baja función RMF; un experto en la técnica tiene conocimiento de, o puede identificar, tales líneas celulares; a modo de ejemplo (aunque sin limitación), como líneas celulares adecuadas se incluyen: MDA435/LCC6, SBC-3/CDDP, MCF7, NCI-H23, NCI-H522, A549/ATCC, EKVX, NCI-H226, NCI-H322M, NCI-H460, HOP-18, HOP-92, LXFL 529, DMS 114, DMS 273, HT29, HCC-2998, HCT-116, COLO 205, KM12, KM20L2, MDA-MB-231/ATCC, MDA-MB-435, MDA-N, BT-549, T-47D, OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, OVCAR-8, IGROV1, SK-OV-3, K-562, MOLT-4, HL-60(TB), RPMI-8226, SR, SN12C, RXF-631, 786-0, TK-10, LOX IMVI, MALME-3M, SK-MEL-2, SK-MEL-5, SK-MEL-28, M14, UACC-62, UACC-257, PC-3, DU-145, SNB-19, SNB-75, SNB-78, U251, SF-268, SF-539, XF 498.

En un aspecto alternativo, la presente invención proporciona el uso de un derivado 39-desmetoxirrapamicina de la invención en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento cánceres o malignidades de las células B RMF. En un aspecto específico, la presente invención proporciona el uso de un derivado 39-desmetoxirrapamicina de la invención en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de cánceres o malignidades de las células B que expresan P-gp. En una realización aún más preferida, la presente invención proporciona el uso de un

derivado 39-desmetoxirrapamicina en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de cánceres o malignidades de las células B que tienen una alta expresión de P-gp. En particular, los cánceres o malignidades de las células B que tienen una alta expresión de P-gp pueden tener una expresión 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces o 100 veces mayor en relación a los niveles de control. Se han descrito anteriormente

5 controles adecuados.
Se discuten además procedimientos para determinar el nivel de expresión de P-gp en una muestra en el presente documento.

Por lo tanto, también se desvela en el presente documento un procedimiento para el tratamiento de cánceres o malignidades de las células B que expresan P-gp que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un derivado 39-desmetoxirrapamicina de la invención. El nivel de expresión de la glicoproteína P (P-gp) en un tipo de cáncer particular puede ser determinado por un experto en la técnica usando técnicas entre las que se incluyen, aunque sin limitación, RT-PCR en tiempo real (Szakács y col., 2004; Stein y col., 2002; Langmann *et al.*; 2003, Álvarez y col., 1995, Boyd y col., 1995), inmunohistoquímica (Stein y col., 2002) o la utilización de micromatrices (Lee y col., 2003); estos procedimientos son facilitados como ejemplos únicamente y otros procedimientos adecuados se le ocurrirán a un experto en la técnica.

Un experto en la técnica podrá determinar por experimentación rutinaria la capacidad de estos compuestos para inhibir el crecimiento fúngico (por ejemplo, Baker, H., y col., 1978; NCCLS Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts: Approved standard M27-A, 17(9). 1997). Adicionalmente, un experto en la técnica podrá determinar por experimentación rutinaria la capacidad de estos compuestos para inhibir el crecimiento de las células tumorales (véanse Dudkin, L. y col., 2001; Yu y col. 2001). En otro aspecto, los compuestos de la presente invención son útiles para inducir inmunosupresión; los ensayos para determinar la eficacia de un compuesto en estas áreas son bien conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, aunque sin limitación: Actividad inmunosupresora - Warner, L.M. y col., 1992, Kahan y col. (1991) & Kahan & Camardo, 2001); Aloinjertos - Fishbein, T.M. y col., 2002, Kirchner y col. 2000; Autoinmune / Inflamatoria / Asma - Carlson, R.P. y col., 1993, Powell, N. y col., 2001; Diabetes I - Rabinovitch, A. y col., 2002; Psoriasis - Reitamo, S. y col., 2001; Artritis reumatoide - Foey, A. y col., 2002; Fibrosis - Zhu, J. y col., 1999, Jain, S. y col., 2001, Gregory y col. 1993.

Se puede demostrar la capacidad de los derivados 39-desmetoxirrapamicina de la invención para inducir inmunodepresión en pruebas estándar usadas para este fin. En otro aspecto, los derivados 39-desmetoxirrapamicina de la presente invención son útiles en la rotación a mecanismos antifibróticos, neuroregenerativos y antiangiogénicos; un experto en la técnica podrá determinar por experimentación rutinaria la capacidad de estos compuestos para prevenir la angiogénesis (por ejemplo, Guba, M. *et al.*, 2002). Un experto en la técnica podrá determinar por experimentación rutinaria la utilidad de estos compuestos para tratar la enfermedad hiperproliferativa vascular, por ejemplo en stents de elución de fármacos (por ejemplo, Morice, M.C. y col., 2002). Adicionalmente, un experto en la técnica podrá determinar por experimentación rutinaria la capacidad neuroregenerativa de estos compuestos (por ejemplo, Myckatyn, T.M. y col., 2002, Steiner y col. 1997).

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un derivado 39-desmetoxirrapamicina de la invención, junto con un soporte farmacéuticamente aceptable.

La rapamicina y compuestos relacionados que están o han estado en pruebas clínicas, tales como CCI-779 y RAD001, tienen pobres perfiles farmacológicos, pobre solubilidad en agua y pobre biodisponibilidad. La presente invención proporciona derivados 39-desmetoxirrapamicina que tienen propiedades mejoradas, tales como mejor estabilidad y/o mayor permeabilidad a través de la membrana celular. Un experto en la técnica podrá determinar fácilmente la solubilidad de un compuesto de la invención dado usando procedimientos estándar. Se muestra un procedimiento representativo en los ejemplos del presente documento.

Adicionalmente, un experto en la técnica podrá determinar la farmacocinética y la biodisponibilidad de un compuesto de la invención usando procedimientos *in vivo* e *in vitro* conocidos para un experto en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, los que se describen más adelante y en los ejemplos; los ensayos alternativos son bien conocidos para un experto en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, los descritos más adelante y en Gallant-Haidner y col., 2000, y Trepanier y col., 1998, y las referencias que allí se dan. Se determina la biodisponibilidad de un compuesto mediante una serie de factores (por ejemplo, solubilidad en agua, velocidad de absorción en el intestino, grado de unión a proteínas y metabolismo), cada uno de los cuales puede ser determinado por pruebas *in vitro* como se describe más adelante; un experto en la técnica apreciará que una mejora en uno o más de estos factores conducirá a una mejora en la biodisponibilidad de un compuesto. De manera alternativa, se puede medir la biodisponibilidad de un compuesto usando procedimientos *in vivo* como se describe con más detalle más adelante.

Ensayo de permeación Caco-2

Se pueden usar células Caco-2 confluentes (Li, A.P., 1992; Grass, G.M. y col., 1992, Volpe, D.A. y col., 2001) en un formato de transpocillos Corning Costar de 24 pocillos, por ejemplo, como el proporcionado por In Vitro Technologies Inc. (IVT Inc., Baltimore, Maryland, USA). La cámara apical contiene 0,15 ml de solución tampón equilibrada de Hank (HBBS), pH 7,4, 1% DMSO, 0,1 mM Amarillo Lucifer. La cámara basal contiene 0,6 ml de HBBS, pH 7,4, 1%

DMSO. Se incuban entonces los controles y los ensayos a 37°C en una incubadora humidificada y se agitan a 130 rpm durante 1 h. El Amarillo Lucifer permea por la vía paracelular (entre las uniones estrechas) únicamente; una elevada Permeabilidad Aparente (P_{app}) para el Amarillo Lucifer indica daño celular durante el ensayo, y todos esos pocillos son rechazados. Se usan propranolol (buena permeación pasiva sin efectos transportadores conocidos) y acebutalol (pobre permeación pasiva atenuada por eflujo activo por glicoproteína P) como compuestos de referencia. Los compuestos pueden ser estudiados en un formato uni- y bidireccional aplicando compuesto a la cámara apical o basal (a 0,01 mM). Los compuestos en las cámaras apical o basal son analizados por HPLC-MS. Los resultados son expresados como Permeabilidad Aparente, P_{app} (nm/s), y como la Razón de Flujo (A a B frente a B a A).

5

$$P_{app} \text{ (nm/s)} = \frac{\text{Volumen de aceptor} \times \Delta[\text{aceptor}]}{\text{Área} \times [\text{donador}] \times \Delta\text{tiempo}}$$

10	Volumen de aceptor:	0,6 ml (A>B) y 0,15 ml (B>A)
	Área de monocapa:	0,33 cm ²
	Δtiempo:	60 min

Un valor positivo para la Razón de Flujo indica eflujo activo desde la superficie apical de las células.

Ensayo de estabilidad de los microsomas hepáticos humanos (MHH)

- 15 Los homogenados de hígado proporcionan una medida de la vulnerabilidad inherente de un compuesto a las enzimas de la Fase I (oxidativa), incluyendo las CYP450 (por ejemplo, CYP2C8, CYP2D6, CYP1A, CYP3A4, CYP2E1), esterasas, amidasas y flavina monooxigenasas (FMO).

20 La vida media (T1/2) de los compuestos de ensayo puede ser determinada por exposición a los Microsomas Hepáticos Humanos, monitorizando su desaparición en el tiempo por LC-MS. Se incuban los compuestos a 0,001 mM durante 40 min a 37°C, 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4, con la fracción subcelular microsomal humana del hígado a 0,25 mg/ml de proteína y niveles de saturación de NADPH como cofactor. A intervalos programados, se añade acetónitrilo a las muestras de ensayo para precipitar la proteína y detener el metabolismo. Se centrifugan las muestras y se analizan en cuanto al compuesto parental por HPLC-MS.

Ensayos de biodisponibilidad *in vivo*

- 25 También se pueden usar ensayos *in vivo* para medir la biodisponibilidad de un compuesto (véase, por ejemplo, Crowe y col., 1999). En general, se administra un compuesto a un animal de ensayo (por ejemplo, ratón o rata) tanto intraperitoneal (i.p.) o intravenosamente (i.v.) como oralmente (p.o.) y se toman muestras de sangre a intervalos regulares para examinar cómo varía la concentración plasmática del fármaco a lo largo del tiempo. Se puede usar el curso temporal de la concentración plasmática a lo largo del tiempo para calcular la biodisponibilidad absoluta del compuesto como porcentaje usando modelos estándar. A continuación se describe un ejemplo de un protocolo típico.

35 Se dosifica a los ratones con 3 mg/kg del compuesto de la invención o del compuesto parental i.v. o 10 mg/kg de un compuesto de la invención o del compuesto parental p.o. Se toman muestras de sangre a intervalos de 5 minutos, 15 minutos, 1 h, 4 h y se determina la concentración del compuesto de la invención o del compuesto parental en la muestra por HPLC. Se puede usar entonces el curso temporal de las concentraciones plasmáticas para derivar parámetros clave, tales como el área bajo la curva de la concentración plasmática-tiempo (AUC - que es directamente proporcional a la cantidad total de fármaco inalterado que alcanza la circulación sistémica), el máximo (pico) de la concentración del fármaco en plasma, el tiempo en el que se produce la concentración máxima del fármaco en plasma (tiempo pico); como factores adicionales utilizados en la determinación precisa de la biodisponibilidad, se incluyen: la vida media terminal del compuesto, la eliminación total del organismo, el volumen de distribución en el estado estacionario y el % de F. Estos parámetros son luego analizados por procedimientos no compartimentales o compartimentales para obtener un porcentaje de biodisponibilidad calculado; para un ejemplo de este tipo de procedimiento, véanse Gallant-Haidner y col., 2000, y Trepanier y col., 1998, y las referencias que allí se citan.

- 45 Los derivados 39-desmetoxirrapamicina de la invención antes mencionados o una formulación de los mismos pueden ser administrados por cualquier procedimiento convencional; por ejemplo, aunque sin limitación, pueden ser administrados por vía parenteral, oral o tópica (incluida la bucal, sublingual o transdérmica), mediante un dispositivo médico (por ejemplo, un stent), por inhalación o por inyección (subcutánea o intramuscular). El tratamiento puede consistir en una sola dosis o en una pluralidad de dosis a lo largo de un período de tiempo.

50 Aunque es posible administrar un compuesto de la invención solo, es preferible presentarlo como una formulación farmacéutica junto con uno o más soportes aceptables. El/los soporte(s) debe(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatibles con el compuesto de la invención y no perjudiciales para sus receptores. Se describen a continuación con más detalle ejemplos de soportes adecuados.

Los derivados 39-desmetoxirrapamicina de la invención pueden ser administrados solos o en combinación con otros agentes terapéuticos; la coadministración de dos (o más) agentes permite usar dosis significativamente inferiores de cada uno de ellos, reduciendo así los efectos colaterales observados.

5 En una realización, se coadministra un derivado 39-desmetoxirrapamicina con otro agente terapéutico para la inducción o el mantenimiento de la inmunosupresión o para el tratamiento del rechazo de trasplantes, de la enfermedad del injerto contra el huésped, de trastornos autoinmunes o de enfermedades inflamatorias; como agentes preferidos, se incluyen, aunque sin limitación, agentes inmunorreguladores, por ejemplo, azatioprina, corticosteroides, ciclofosfamida, ciclosporina A, FK506, micofenolato mofetilo, OKT- 3 y ATG.

10 En una realización alternativa, se coadministra un derivado 39-desmetoxirrapamicina con otro agente terapéutico para el tratamiento del cáncer o de las malignidades de las células B; como agentes preferidos, se incluyen, aunque sin limitación, metotrexato, leukovorina, adriamicina, prednisona, bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina, vinorelbina, doxorubicina, tamoxifeno, toremifeno, acetato de megestrol, anastrozol, goserelina, anticuerpo monoclonal anti-HER2 (por ejemplo, Herceptin™), capecitabina, clorhidrato de raloxifeno, inhibidores de EGFR (por ejemplo, Iressa®, Tarceva™, Erbitux™), inhibidores de VEGF (por ejemplo, Avastin™), inhibidores de proteasomas (por ejemplo, Velcade™), Glivec® o inhibidores de hsp90 (por ejemplo, 17-AAG). Adicionalmente, se puede administrar un derivado 39-desmetoxirrapamicina en combinación con otras terapias, incluyendo, aunque sin limitación, radioterapia o cirugía.

20 En una realización, se coadministra un derivado 39-desmetoxirrapamicina con otro agente terapéutico para el tratamiento de la enfermedad vascular; como agentes preferidos, se incluyen, aunque sin limitación, inhibidores de ACE, antagonistas de los receptores de angiotensina II, derivados de ácido fibrótico, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, agentes bloqueantes beta-adrenérgicos, bloqueantes de los canales del calcio, antioxidantes, anticoagulantes e inhibidores de plaquetas (por ejemplo, Plavix™).

25 En una realización, se coadministra un derivado 39-desmetoxirrapamicina con otro agente terapéutico para la estimulación de la regeneración neuronal; como agentes preferidos, se incluyen, aunque sin limitación, factores neurotróficos, por ejemplo, factor de crecimiento de los nervios, factor de crecimiento derivado de la glía, factor de crecimiento derivado del cerebro, factor neurotrófico ciliar y neurotrofina-3.

30 En una realización, se coadministra un derivado 39-desmetoxirrapamicina con otro agente terapéutico para el tratamiento de las infecciones fúngicas; como agentes preferidos, se incluyen, aunque sin limitación, anfotericina B, flucitosina, equinocandinas (por ejemplo, caspofungina, anidulafungina o micafungina), griseofulvina, un agente antifúngico imidazol o triazol (por ejemplo, clotrimazol, miconazol, ketoconazol, econazol, butoconazol, oxiconazol, terconazol, itraconazol, fluconazol o voriconazol).

35 En coadministración, se incluye cualquier medio de administración de dos o más agentes terapéuticos al paciente como parte del mismo régimen de tratamiento, como será evidente para el experto. Aunque los dos o más agentes pueden ser administrados simultáneamente en una sola formulación, esto no es esencial. Los agentes pueden ser administrados en diferentes formulaciones y en diferentes tiempos.

40 Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden ser preparadas por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en el campo de la farmacia. Dichos procedimientos incluyen la etapa de asociación del principio activo (compuesto de la invención) con el soporte, que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones son preparadas asociando uniforme e íntimamente el principio activo con soportes líquidos o soportes sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

45 Los derivados 39-desmetoxirrapamicina de la invención serán normalmente administrados oralmente o por cualquier vía parenteral, en forma de una formulación farmacéutica que comprende el principio activo, opcionalmente en forma de una sal de adición de ácido o de base orgánicos o inorgánicos no tóxicos, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno y del paciente que haya que tratar, así como de la vía de administración, las composiciones pueden ser administradas a dosis variables.

Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden ser administrados oral, bucal o sublingualmente en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes saborizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada.

50 Las soluciones o suspensiones de derivados 39-desmetoxirrapamicina adecuadas para administración oral pueden también contener excipientes, por ejemplo, N,N-dimetilacetamida, dispersantes, por ejemplo, polisorbato 80, surfactantes y solubilizadores, por ejemplo, polietilenglicol, Phosal 50 PG (que consiste en fosfatidilcolina, ácidos grasos de soja, etanol, mono/diglicéridos, propilenglicol y palmitato de ascorbilo).

55 Dichos comprimidos pueden contener excipientes, tales como celulosa microcristalina, lactosa (por ejemplo, lactosa monohidrato o lactosa anhidra), citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dibásico de calcio y glicina, desintegrantes, tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de sodio y almidón, croscarmelosa sodio y ciertos silicatos complejos, y ligantes de granulación, tales como polivinilpirrolidona,

hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), macrogol 8000, sacarosa, gelatina y acacia. Adicionalmente, se pueden incluir agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

5 También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Como excipientes preferidos a este respecto, se incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, se pueden combinar los compuestos de la invención con diversos agentes edulcorantes o saborizantes, materias colorantes o tintes, agentes emulsionantes y/o suspensores y diluyentes, tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y sus combinaciones.

10 Se puede preparar un comprimido por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Se pueden preparar comprimidos comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma libremente fluible, tal como un polvo o gránulos, opcionalmente en mezcla con un ligante (por ejemplo, povidona, gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante (por ejemplo, glicolato de sodio y almidón, povidona entrecruzada, carboximetilcelulosa sodio entrecruzada), agente tensoactivo o dispersante. Se pueden preparar comprimidos moldeados moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden estar opcionalmente recubiertos o perforados y pueden ser formulados para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo de su interior usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para obtener el perfil de liberación deseado.

20 Las formulaciones según la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas, tales como cápsulas, sellos o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo puede también presentarse como un bolo, un electuario o una pasta.

25 Como formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca, se incluyen pastillas para chupar que comprenden el principio activo en una base saborizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia; y colutorios que comprenden el principio activo en un soporte líquido adecuado.

30 Habría que entender que, además de los ingredientes particularmente mencionados con anterioridad, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica considerando el tipo de formulación en cuestión; por ejemplo, los que son adecuados para administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

35 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica pueden ser formuladas como ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, apósitos impregnados, sprays, aerosoles o aceites, dispositivos transdérmicos, polvos espolvoreables y similares. Estas composiciones pueden ser preparadas por procedimientos convencionales que contienen el principio activo. Así, pueden comprender también soportes y aditivos convencionales compatibles, tales como conservantes, solventes para ayudar a la penetración del fármaco, emolientes en cremas o ungüentos y etanol o alcohol oleílico para lociones. Dichos soportes pueden estar presentes en de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 98% de la composición. Más normalmente, formarán hasta 40 aproximadamente un 80% de la composición. Sólo como ilustración, se prepara una crema o ungüento mezclando cantidades suficientes de material hidrofílico y agua, con un contenido de aproximadamente un 5-10% en peso del compuesto, en cantidades suficientes para producir una crema o ungüento que tiene la consistencia deseada.

45 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos destinados a permanecer en íntimo contacto con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado. Por ejemplo, el principio activo puede ser administrado desde el parche por iontoforesis.

Para aplicaciones a tejidos externos, por ejemplo la boca y la piel, las composiciones son preferiblemente aplicadas como un ungüento o una crema tópica. Cuando se formula en un ungüento, el principio activo puede ser empleado con una base de ungüento parafínica o miscible en agua.

50 De manera alternativa, el principio activo puede ser formulado en una crema con una base de aceite en agua o una base de agua en aceite.

Para administración parenteral, se preparan formas de dosificación unitaria fluidas utilizando el principio activo y un vehículo estéril, por ejemplo, aunque sin limitación, agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, siendo preferida el agua. El principio activo, dependiendo del vehículo y de la concentración utilizados, puede ser suspendido o disuelto en el vehículo. Al preparar soluciones, el principio activo puede ser disuelto en agua para 55 inyección y esterilizado por filtración antes de introducirlo en un vial o ampolla adecuados y de sellar estos últimos.

Ventajosamente, se pueden disolver en el vehículo agentes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes tamponantes. Para aumentar la estabilidad, se puede congelar la composición después de introducirla en el vial y de

eliminar el agua a vacío. Se sella entonces el polvo liofilizado seco en el vial y se puede suministrar un vial acompañante de agua para inyección para reconstituir el líquido antes de su uso.

5 Se preparan suspensiones parenterales substancialmente del mismo modo que las soluciones, excepto por suspender el principio activo en el vehículo en lugar de disolverlo y por no poder ir la esterilización acompañada de filtración. Se puede esterilizar el principio activo por exposición a óxido de etileno antes de suspenderlo en el vehículo estéril. Ventajosamente, se incluye un surfactante o agente humectante en la composición para facilitar la distribución uniforme del principio activo.

10 Los compuestos de la invención pueden ser también administrados usando dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, se puede administrar una composición farmacéutica de la invención con un dispositivo de inyección hipodérmico sin aguja, tal como los dispositivos desvelados en U.S. 5.399.163, U.S. 5.383.851, U.S. 5.312.335, U.S. 5.064.413, U.S. 4.941.880, U.S. 4.790.824 o U.S. 4.596.556. Como ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención, se incluyen: US 4.487.603, que desvela una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; US 4.486.194, que desvela un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; US 4.447.233, que desvela una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad de infusión precisa; US 4.447.224, que desvela un aparato de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármacos; US 4.439.196, que desvela un sistema de suministro osmótico de fármacos que tiene compartimentos multicámara; y US 4.475.196, que desvela un sistema de suministro osmótico de fármacos. En una realización específica, el derivado 39-desmetoxirrapamicina puede ser administrado usando un stent de elución de fármaco, por ejemplo correspondiente a los descritos en WO 01/87263 y publicaciones relacionadas o los descritos por Perin (Perin, EC, 2005). Muchos otros de tales implantes, sistemas de suministro y módulos son conocidos para los expertos en la técnica.

25 La dosificación que se ha de administrar de un derivado 39-desmetoxirrapamicina de la invención variará según el compuesto particular, la enfermedad implicada, el sujeto, la naturaleza y gravedad de la enfermedad, la condición física del sujeto y la vía de administración seleccionada. La dosificación apropiada puede ser fácilmente determinada por un experto en la técnica.

Las composiciones pueden contener desde un 0,1% en peso, preferiblemente un 5-60%, más preferiblemente un 10-30% en peso, de un compuesto de la invención, dependiendo del procedimiento de administración.

30 Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad óptima y el espaciado de las dosificaciones individuales de un compuesto de la invención vendrán determinados por la naturaleza y el alcance de la afección que se esté tratando, la forma, vía y sitio de administración y la edad y condición del sujeto particular en tratamiento, y que un médico determinará en último lugar las dosificaciones apropiadas que se hayan de usar. Esta dosificación puede ser repetida tan a menudo como sea apropiado. Si se desarrollan efectos colaterales, se pueden alterar o reducir la cantidad y/o la frecuencia de la dosificación, según la práctica clínica normal.

35 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1: muestra la estructura de la rapamicina.

Figura 2: muestra la ruta de fragmentación para la 39-desmetoxirrapamicina.

Figura 3: muestra la ruta de fragmentación para la 39-desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroximetil)propionil]rapamicina.

40 Figura 4: muestra la ruta de fragmentación para la 39-desmetoxi-40-O-[3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato de 2-hidroxietilo]rapamicina.

Figura 5: muestra la ruta de fragmentación para la 27-O-desmetil-39-desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroximetil)propionil]rapamicina.

45 Figura 6: muestra la actividad inhibitoria de mTOR de la 39-desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroximetil)propionil]rapamicina (A - triángulos rellenos) y de la 39-desmetoxi-40-O-(2-hidroxi)etilrapamicina (B - triángulos rellenos) en comparación con la rapamicina (cuadrados rellenos).

Ejemplos

Métodos y materiales generales

Materiales

50 Todos los reactivos fueron obtenidos de fuentes comerciales y se usaron sin mayor purificación, a menos que se indique lo contrario.

Cultivo

55 Se mantuvo *S. hygroscopicus* MG2-1,0 [IJMNOQLhis] (WO 04/007709; Gregory y col., 2004) en placas de agar de medio 1 (véase más adelante) a 28°C. Se prepararon stocks de esporas tras crecimiento en medio 1, se conservaron en glicerol al 20% p/v: lactosa al 10% p/v en agua destilada y se guardaron a -80°C. Se prepararon cultivos vegetativos inoculando 0,1 ml de stock congelado en 50 ml de medio 2 (véase más adelante) en un matraz

ES 2 527 530 T3

de 250 ml. Se incubó el cultivo durante 36 a 48 horas a 28°C, 300 rpm.

Procedimiento de producción

Se inocularon los cultivos vegetativos a un 2,5 - 5% v/v en medio 3. Se realizó el cultivo durante 6-7 días, 26°C, 300 rpm.

5 Procedimiento de alimentación

Se realizó la alimentación/adición del ácido carboxílico seleccionado 24 - 48 horas después de la inoculación y se alimentó a 1-2 mM a menos que se indique lo contrario.

Medio 1

Componente	Fuente	Catálogo #	Por l
Polvo de maíz macerado	Sigma	C-8160	2,5 g
Extracto de levadura	Difco	0127-17	3 g
Carbonato de calcio	Sigma	C5929	3 g
Sulfato de hierro	Sigma	F8633	0,3 g
BACTO agar	Difco	2140-10	20 g
Almidón de trigo	Sigma	S2760	10 g
Agua hasta			1 l

10 Se esterilizó entonces el medio por autoclavado a 121°C, 20 min.

Medio 2: Medio de semillas RapV7

Componente	Por l
Toasted Nutrisoy (ADM Ingredients Ltd)	5 g
Avedex W80 dextrin (Deymer Ingredients Ltd)	35 g
Sólidos de maíz macerados (Sigma)	4 g
Glucosa	10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
Ácido láctico (80%)	1,6 ml
CaCO ₃ (Caltec)	7 g
Ajustar pH a 7,5 con NaOH 1 M	

Se esterilizó entonces el medio por autoclavado a 121°C, 20 min.
Tras la esterilización, se añaden 0,16 ml de glucosa al 40% a cada 7 ml de medio.

15

Medio 3: medio MD6 (medio de fermentación)

Componente	Por l
Toasted Nutrisoy (ADM Ingredients Ltd)	30 g
Almidón de maíz (Sigma)	30 g
Avedex W80 dextrin (Deymer Ingredients Ltd)	19 g
Levadura (Allinson)	3 g
Sólidos de maíz macerados (Sigma)	1 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
NaCl	5 g
CaCO ₃ (Caltec)	10 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,5 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	120 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg
MES (ácido 2-morfolinoetanosulfúrico monohidrato)	21,2 g

Corregir pH a 6,0 con NaOH 1M

Antes de la esterilización, se añadieron 0,4 ml de α -amilasa de Sigma (BAN 250) a 1 l de medio.

Se esterilizó el medio durante 20 min a 121°C.

Tras la esterilización, se añadieron 0,35 ml de fructosa al 40% estéril y 0,10 ml de L-lisina (140 mg/ml en agua, esterilizada por filtración) a cada 7 ml.

5

Medio 4: Medio de semillas Rap V7a

Componente	Por l
Toasted Nutrisoy (ADM Ingredients Ltd)	5 g
Avedex W80 dextrin (Deymer Ingredients Ltd)	35 g
Sólidos de maíz macerados (Sigma)	4 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
Ácido láctico (80%)	1,6 ml
CaCO ₃ (Caltec)	7 g
Ajustar pH a 7,5 con NaOH 1 M	

Se esterilizó entonces el medio por autoclavado a 121°C, 20 min.

Medio 5: medio MD6/5-1 (medio de fermentación)

Componente	Por l
Toasted Nutrisoy (ADM Ingredients Ltd)	15 g
Avedex W80 dextrin (Deymer Ingredients Ltd)	50 g
Levadura (Allinson)	3 g
Sólidos de maíz macerados (Sigma)	1 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
NaCl	13 g
CaCO ₃ (Caltec)	10 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	3,5 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	15 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	150 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	60 mg
SAG 471	0,1 ml

- 10 Se esterilizó el medio durante 30 min a 121°C.
Tras la esterilización, se añadieron 15 g de fructosa por l.
Después de 48 h, se añadieron 0,5 g/l de L-lisina.

Métodos analíticos

Procedimiento A

- 15 Volumen de inyección: 0,005-0,1 ml (según se requiera dependiendo de la sensibilidad). Se realizó una HPLC en cartuchos SB C8 Agilent "Spherisorb" "Rápida Resolución", 3 micras, 30 mm x 2,1 mm, con una fase móvil de:

Fase móvil A: Ácido fórmico al 0,01% en agua pura
Fase móvil B: Ácido fórmico al 0,01% en acetonitrilo
Caudal: 1 ml/minuto

- 20 Se usó un gradiente lineal, de un 5% de B a 0 min a un 95% de B a 2,5 min manteniendo a un 95% de B hasta 4 min y volviendo a un 5% de B hasta el siguiente ciclo. La detección fue por absorbancia UV a 254 nm y/o por ionización por electropulverización de espectrometría de masas (positiva o negativa) utilizando un instrumento Micromass Quattro-Micro.

Procedimiento B

- 25 Volumen de inyección: 0,02 ml. Se realizó una HPLC en una columna BDS C18 Hypersil de 3 micras

(ThermoHypersil-Keystone Ltd), 150 x 4,6 mm, mantenida a 50°C, con una fase móvil de:

Fase móvil A:	Acetonitrilo (100 ml), ácido trifluoroacético (1 ml), acetato de amonio 1 M (10 ml) llevada a 1 l con agua desionizada.
Fase móvil B:	Agua desionizada (100 ml), ácido trifluoroacético (1 ml), acetato de amonio 1 M (10 ml) llevada a 1 l con acetonitrilo.
Caudal:	1 ml/minuto

5 Se usó un gradiente lineal de un 55% de B - 95% de B a lo largo de 10 minutos, seguido de 2 minutos a un 95% de B, 0,5 minutos a un 55% de B y otros 2,5 minutos a un 55% de B. Se realizó la detección del compuesto por absorbancia UV a 280 nm.

Procedimiento C

El sistema de HPLC comprendía una Agilent HP1100 y se llevó a cabo en una columna BDS C18 Hypersil de 3 micras (Thermo- Hypersil-Keystone Ltd), 150 x 4,6 mm, mantenida a 40°C, con una fase móvil de:

Fase móvil A:	agua desionizada
Fase móvil B:	acetonitrilo
Caudal:	1 ml/minuto

10 Se acopló el sistema a un espectrómetro de masas de electropulverización Bruker Daltonics Esquire3000. Se usó un cambio positivo negativo en un rango de barrido de 500 a 1.000 Dalton. Se usó un gradiente lineal de un 55% de B - 95% de B a lo largo de 10 minutos, seguido de 2 minutos a un 95% de B, 0,5 minutos a un 55% de B y otros 2,5 minutos a un 55% de B.

15 *Procedimientos sintéticos*

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en condiciones anhidras, a menos que se indique lo contrario, usando solventes desecados comercialmente disponibles. Las reacciones fueron monitorizadas por LC-UV-MS, en un HPLC Agilent 1100 acoplado a un espectrómetro de masas Bruker Daltonics Esquire3000+ equipado con una fuente de electropulverización. Se consiguió la separación en una columna Phenomenex Hyperclone, BDS C₁₈ 3u (150 x 4,6 mm) a 1 ml/min, con un gradiente lineal de agua:acetonitrilo v:v 30:70 a 100% de acetonitrilo a lo largo de 10 min, seguido de un período isocrático de 5 min a un 100% de acetonitrilo.

20 Se registraron los espectros de RMN en CDCl₃ y las desviaciones químicas δ_H y δ_C están referidas al solvente (7,26 ppm y 77,0 ppm respectivamente). Dado que la 39-desmetoxirrapamicina y sus derivados existen como una mezcla de confórmeros, todas las asignaciones corresponden únicamente al confórmero principal.

25 *Bioensayo in vitro para la actividad anticancerosa*

Se realizó la evaluación *in vitro* de los compuestos en cuanto a su actividad anticancerosa en un panel de 12 líneas de células tumorales humanas en un ensayo de proliferación en monocapa en la Oncotest Testing Facility, Institute for Experimental Oncology, Oncotest GmbH, Freiburg. En la Tabla 1 se resumen las características de las 12 líneas celulares seleccionadas.

30 **Tabla 1 Líneas celulares de ensayo**

#	Línea celular	Características
1	MCF-7	Mama, estándar NCI
2	MDA-MB-231	Mama - PTEN positiva, resistente a 17-AAG
3	MDA-MB-468	Mama - PTEN negativa, resistente a 17-AAG
4	NCI-H460	Pulmón, estándar NCI
5	SF-268	SNC, estándar NCI
6	OVCAR-3	Ovárica - mutada en p85. Amplificada por AKT
7	A498	Renal, alta expresión de RMF
8	GXF 251 L	Gástrica
9	MEXF 394NL	Melanoma
10	UXF 1138L	Útero
11	LNCAP	Próstata - PTEN negativa
12	DU145	Próstata - PTEN positiva

Se establecieron las líneas celulares Oncotest a partir de xenoinjertos tumorales humanos como describen Roth y col. 1999. El origen de los xenoinjertos donantes fue descrito por Fiebig y col. 1999. Se obtuvieron otras líneas celulares del NCI (H460, SF-268, OVCAR-3, DU145, MDA-MB-231, MDA-MB-468) o se compraron a DSMZ, Braunschweig, Alemania (LNCAP).

- 5 Todas las líneas celulares, a menos que se indique lo contrario, son cultivadas a 37°C en una atmósfera humidificada (95% de aire, 5% de CO₂) en un medio 'listo para mezclar' que contiene medio RPMI 1640, un 10% de suero fetal de ternera y 0,1 mg/ml de gentamicina (PAA, Cölbe, Alemania).

Ensayo en monocapa - breve descripción del protocolo 1:

- 10 Se usó un ensayo con yoduro de propidio modificado para valorar los efectos del/de los compuesto(s) de ensayo sobre el crecimiento de doce líneas celulares tumorales humanas (Dengler y col., (1995)).

- 15 Para explicarlo brevemente, se recogieron las células de cultivos en fase exponencial por tripsinización, se contaron y se plaquearon en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de células dependiente de la línea celular (5 -10.000 células viables/pocillo). Después de 24 h de recuperación para permitir que las células reasumieran el crecimiento exponencial, se añade 0,01 ml de medio de cultivo (6 pocillos de control por placa) o medio de cultivo que contiene mabecina a los pocillos. Se plaquea cada concentración por triplicado. Se aplican los compuestos en dos concentraciones (0,001 µM y 0,01 µM). Después de 4 días de exposición continua, se substituye el medio de cultivo celular con o sin compuesto de ensayo por 0,2 ml de una solución acuosa de yoduro de propidio (PI) (7 mg/l). Para medir la proporción de células vivas, se permeabilizan las células congelando las placas. Después de descongelar las placas, se mide la fluorescencia usando el lector de microplacas Cytofluor 4000 (excitación 530 nm, emisión 620 nm), que da una relación directa con el número total de células viables.

- 20 La inhibición del crecimiento es expresada como tratado/control x 100 (% T/C). Para los compuestos activos, se estimaron los valores de la CI₅₀ y la CI₇₀ representando la concentración del compuesto frente a la viabilidad celular.

Ejemplo 1. Fermentación y aislamiento de la 39-desmetoxirrapamicina

- 25 Se produjo 39-desmetoxirrapamicina haciendo crecer cultivos de *S. hygrosopicus* MG2-10 [IJMNOQLhis] y alimentando con ácido ciclohexanocarboxílico (CHCA) como se describe a continuación.

Cultivo líquido

- 30 Se cultivó un cultivo vegetativo de *S. hygrosopicus* MG2-10 [IJMNOQLhis] como se describe en Materiales y Métodos. Se inocularon los cultivos de producción con cultivo vegetativo a razón de 0,5 ml en 7 ml de medio 3 en tubos de 50 ml. Se llevó a cabo el cultivo durante 7 días, 26°C, 300 rpm. Se extrajeron muestras de 1 ml en acetonitrilo 1:1 con agitación durante 30 min, se centrifugaron durante 10 min a 13.000 rpm y se analizaron y cuantificaron según el Procedimiento de análisis B (véase Materiales y Métodos). Se determinó la confirmación del producto por espectrometría de masas usando el Procedimiento de análisis C (véase Materiales y Métodos). Se propuso que el análogo de rapamicina observado era la 39-desmetoxirrapamicina deseada en base a los datos analíticos discutidos más adelante en la caracterización.

35 Fermentación

- Se cultivó un cultivo vegetativo primario en Medio 4 de *S. hygrosopicus* MG2-10 [IJMNOQLhis] esencialmente como se describe en Materiales y Métodos. Se inoculó un cultivo vegetativo secundario en Medio 4 a un 10% v/v, 28°C, 250 rpm, durante 24 h. Se inocularon los cultivos vegetativos a un 5% v/v en medio 5 (véase Materiales y Métodos) en un fermentador de 20 l. Se realizó el cultivo durante 6 días a 26°C, 0,5 vvm. Se mantuvo ≥ 30% de oxígeno disuelto alterando la velocidad de la punta de la hélice, velocidad mínima de la punta de 1,18 ms⁻¹, velocidad máxima de la punta de 2,75 ms⁻¹. Se realizó la alimentación de ácido ciclohexanocarboxílico a las 24 y a las 48 horas después de la inoculación, para obtener una concentración final de 2 mM.

Extracción y purificación

- 45 Se agitó el caldo de fermentación (30 l) con igual volumen de metanol durante 2 horas y se centrifugó después para obtener una pella de células (10 min, 3.500 rpm). Se agitó el sobrenadante con resina Diaion[®] HP20 (43 g/l) durante 1 hora y se filtró después. Se lavó la resina a modo de lotes con acetona para purificar el análogo de rapamicina y se eliminó el solvente a vacío. Se diluyó luego el concentrado acuoso a 2 l con agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 2 l). Se eliminó el solvente a vacío, para obtener un aceite marrón (20,5 g).

- 50 Se disolvió el extracto en acetona, se secó sobre sílice, se aplicó a una columna de sílice (6 x 6,5 cm de diámetro) y se eluyó con un gradiente por etapas de acetona/hexano (20% - 40%). Se juntaron las fracciones que contenían el análogo de rapamicina y se eliminó el solvente a vacío. Se cromatografió luego el residuo (2,6 g) (en tres lotes) sobre Sephadex LH20, eluyendo con 10:10:1 cloroformo/heptano/etanol. Se purificó el análogo de rapamicina semipurificado (1,7 g) por HPLC preparatoria de fase invertida (C18) usando un HPLC Gilson, eluyendo una columna Phenomenex 21,2 x 250 mm Luna 5 µm C18 BDS con 21 ml/min de acetonitrilo al 65%/agua. Se

combinaron las fracciones más puras (identificadas por HPLC analítica, Procedimiento B) y se eliminó el solvente a vacío, para obtener 39-desmetoxirrapamicina (563 mg).

Caracterización

5 El espectro de ^1H RMN de la 39-desmetoxirrapamicina era equivalente al de un patrón (P. Lowden, Ph.D. Dissertation, University of Cambridge, 1997). ^{13}C -RMN (125 MHz), δ_{C} (ppm): 215,75, 208,27, 169,19, 166,71, 140,13, 135,94, 133,61, 130,10, 129,62, 126,80, 126,33, 98,42, 84,77, 84,37, 75,85, 70,91, 67,10, 59,44, 55,82, 51,21, 46,50, 44,17, 41,39, 40,70, 40,16, 38,74, 38,37, 35,44, 35,26, 35,08, 33,78, 33,64, 33,04, 32,37, 31,22, 30,41, 27,24, 27,02, 25,27, 21,48, 20,58, 16,24, 15,95, 15,78, 13,74, 13,00, 10,12.

10 El análisis de LCMS y LCMSⁿ de extractos de cultivo mostró que la razón m/z para el nuevo análogo de rapamicina es 30 unidades de masa atómica menor que el de la rapamicina, lo cual es consistente con la ausencia de un grupo metoxi. Iones observados: $[\text{M}-\text{H}]^-$ 882,3, $[\text{MINH}]^+$ 901,4, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 906,2, $[\text{M}+\text{K}]^+$ 922,2. La fragmentación del aducto de sodio dio los iones predichos para la 39-desmetoxirrapamicina siguiendo una ruta de fragmentación previamente identificada (Figura 2) (J. A. Reather, Ph.D. Dissertation, University of Cambridge, 2000). Estos datos de fragmentación de espectrometría de masas estrechan la región del nuevo análogo de rapamicina en la que se ha producido la pérdida de un metoxi al fragmento C28-C42 que contiene el resto ciclohexilo. Estos datos de fragmentación de espectrometría de masas son totalmente consistentes con la 39-desmetoxirrapamicina.

Ejemplo 2: 39-desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroximetil)propionil]rapamicina

Se sintetizó 39-desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroximetil)propionil]rapamicina a partir de 39-desmetoxirrapamicina según el siguiente procedimiento.

20 2.1 Síntesis de 39-desmetoxi-28-O-trimetilsililrapamicina

Se disolvieron 39-desmetoxirrapamicina (170 mg, 0,17 mmol) e imidazol (51 mg, 0,75 mmol) en 5 ml de acetato de etilo a 0°C. Se añadió a esta solución fría clorotrimetilsilano (77 mg, 0,09 ml, 0,71 mmol) gota a gota a lo largo de un período de 10 min. Se continuó agitando durante 60 min más para completar la formación del éter 28,39-bis-O-trimetilsilílico. Después de ese período, se añadieron 0,4 ml de ácido sulfúrico acuoso 0,5 N y se agitó la mezcla durante 2,5 h a 0°C. Se añadieron 20 ml de acetato de etilo y se lavó la capa orgánica con solución salina acuosa saturada, una solución saturada de hidrógeno carbonato de sodio y agua. La desecación sobre sulfato de sodio y la concentración a presión reducida dieron el éter 28-O-trimetilsilílico como un sólido incoloro, que fue usado sin mayor purificación para la reacción siguiente.

30 ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4,07 (d, 1H, $J=6,5$ Hz, C(28)-H), 0,00 (s, 9H, 28-O-TMS). MS (ESI) m/z 978 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

2.2. Síntesis de anhídrido 2,4,6-triclorobenzoico 2',2',5'-trimetil-1',3'-dioxano-5'-carboxílico

Se añadieron 2,2-dimetoxipropano (13,5 g, 130 mmol) y ácido *p*-toluensulfónico monohidrato (100 mg, 0,53 mmol, 0,4% mol) a una solución de ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (13,5 g, 100 mmol) en acetona (100 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h. Después de ese período, se añadió hidrógeno carbonato de sodio húmedo y se agitó la mezcla durante 5 minutos más. Se decantó el sobrenadante y se concentró a presión reducida. Se trató el sólido resultante con éter dietílico (3 x 50 ml) y se concentraron los extractos orgánicos combinados a presión reducida, para obtener un sólido blanco, 16,2 g (93%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4,19 (d, 1H, $J=12,0\text{Hz}$) 3,68 (d, 1H, $J=12,0\text{Hz}$) 1,45 (s, 1H) 1,41 (s, 1H) 1,20 (s, 1H).

40 Se convirtió entonces este material en un anhídrido mixto activado mediante el procedimiento de US 5.362.718. Así, se disolvió el acetónido (1,04 g, 5,98 mmol) en THF (20 ml), se enfrió hasta 0°C y se trató mediante adición gota a gota de trietilamina (0,83 ml, 5,98 mmol) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoílo (0,93 ml, 5,98 mmol). Se agitó luego la reacción a temperatura ambiente durante 5 horas. Se filtró el precipitado resultante y se lavó con THF (10 ml). Se redujo el filtrado combinado a vacío a un sólido amorfo blanco, que fue usado (como se indica a continuación) sin mayor purificación.

45 2.3. Síntesis de 39-desmetoxirrapamicina 28-O-trimetilsilil éter, 40-éster con ácido 2,2,5-trimetil[1,3-dioxano]-5-carboxílico

Se disolvió 28-O-trimetilsilil-39-desmetoxirrapamicina bruta (200 mg, a partir de 0,17 mmol de 39-desmetoxirrapamicina) del ejemplo 2,1 en 2 ml de diclorometano. Se enfrió la solución hasta 0°C y se añadió DMAP (102 mg, 0,84 mmol). Se añadió luego una solución de anhídrido 2,4,6-triclorobenzoico 2',2',5'-trimetil-1',3'-dioxano-5' carboxílico (159 mg, 0,42 mmol) en 1 ml de diclorometano a lo largo de un período de 10 min. Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 5 h y se monitorizó la conversión por LC/MS. Se diluyó la mezcla de reacción con 7 ml de diclorometano y se apagó por adición de 5 ml de agua. Se separó la capa orgánica y se lavó sucesivamente con ácido sulfúrico 0,5 N, solución de hidrógeno carbonato de sodio y agua. La desecación sobre sulfato de sodio y la concentración a presión reducida dieron el compuesto del título como una espuma incolora, que fue usada inmediatamente sin mayor purificación. MS (ESI) m/z 1111 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

2.4. 39-Desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroximetil)propionil]rapamicina

Se disolvió el éter 39-desmetoxirrapamicin-28-O-trimetilsilílico bruto, 40-éster con ácido 2,2,5-trimetil[1,3-dioxano]-5-carboxílico del ejemplo 2,3 en 2 ml de acetona y se añadieron 0,5 ml de ácido sulfúrico 0,5 N. Se agitó la mezcla de reacción durante 5 h a temperatura ambiente y se neutralizó después por adición de 5 ml de solución saturada de hidrógeno carbonato de sodio y 5 ml de agua. Se extrajo la mezcla acuosa con acetato de etilo y se secaron los extractos orgánicos combinados sobre sulfato de sodio. La concentración a presión reducida dio un sólido incoloro, que fue purificado por cromatografía de exclusión por tamaños en Sephadex LH20 usando cloroformo/heptano/etanol (v:v:v 10:10:1) como eluyentes.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4,72 (m, 1 H, C(40)-H), 3,87 (m, 2H), 3,69 (m, 2H), 1,03 (s, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 175,52, 74,04 (C(40)), 68,73 (2C), 48,90, 17,09. MS (ESI) m/z 1023 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Ejemplo 3: 39-Desmetoxi-40-O-(2-hidroxi)etilrapamicina

3.1. Triflato de 2-(*terc*-butildimetilsilil)oxietilo

Se enfrió una solución de 2-(*terc*-butildimetilsilil)etilenglicol (125 mg, 0,71 mmol) y 2,6-lutideno (0,08 ml, 0,69 mmol) en 6 ml de diclorometano hasta -78°C . Se añadió anhídrido trifluorometanosulfónico (0,11 ml, 0,65 mmol) a lo largo de un período de 5 min y se continuó agitando durante 15 min más a -78°C para completar la formación del triflato. Se usó el triflato *in situ* para la reacción que se describe en 3,2 a continuación.

3.2. 40-O-[2-(*terc*-Butildimetilsilil)]etil-39-desmetoxirrapamicina

Se trataron 39-desmetoxirrapamicina (300 mg, 0,34 mmol) y 2,6-di-*terc*-butilpiridina (1,5 ml, 6,68 mmol) con triflato de 2-(*terc*-butildimetilsilil)oxietilo (0,65 mmol en 6 ml de diclorometano) a temperatura ambiente. Se concentró esta solución a un tercio de su volumen original con una suave corriente de nitrógeno y se agitó la suspensión resultante durante 72 h más a temperatura ambiente. Después de ese período, se añadieron solución saturada de hidrógeno carbonato de sodio (5 ml) y agua (5 ml) y se agitó la mezcla durante 30 min. Se separó la capa orgánica y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (2 x 5 ml). Se secaron los extractos orgánicos combinados sobre sulfato de sodio y se concentraron a presión reducida, para obtener un aceite incoloro. La purificación por cromatografía en columna de sílice usando un gradiente de hexano a hexano/acetona (v:v 1:1) dio el producto como un sólido incoloro.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4,16 (d, 1H, $J = 6,5$ Hz, C(28)-H), 3,73 (t, 2H, $J = 5,7$ Hz), 3,52 (t, 2H, $J = 5,7$ Hz), 0,89 (s, 9H), 0,06 (s, 6H); $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 76,61 (C-40), 69,31 (CH_2), 63,03 (CH_2), 25,92 (3C), 18,36, -5,23 (2C).

MS (ESI) m/z 1065 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3.3. 39-Desmetoxi-40-O-(2-hidroxi)etilrapamicina

Se trató una solución de 40-O-[2-(*terc*-butildimetilsilil)]etil-39-desmetoxirrapamicina (160 mg, 0,15 mmol) en 2 ml de acetona con 0,3 ml de ácido sulfúrico 0,5 N a temperatura ambiente. Se dejó que la solución reposara a temperatura ambiente durante 3 h y se apagó después por adición de 5 ml de solución saturada de hidrógeno carbonato de sodio y 10 ml de agua. Se extrajo la mezcla acuosa con acetato de etilo (3 x 10 ml) y se secaron los extractos orgánicos combinados sobre sulfato de sodio. La concentración a presión reducida dio un sólido incoloro, que fue purificado por HPLC (agua/acetoneitrilo v:v 20/80).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4,16 (d, 1H, $J = 6$ Hz), 3,70 (m, 2H), 3,57 (m, 2H), 3,20 (m, 1H, C(40)-H); $^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 78,65 (C-40), 77,20 (C-28), 68,93 (CH_2O), 62,10 (CH_2O).

MS (ESI) m/z 951 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Ejemplo 4 39-Desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroximetil)propionil]rapamicina a través de esterificación catalizada por lipasa de 39-desmetoxirrapamicina

Se calentó una mezcla de 39-desmetoxirrapamicina (720 mg, 0,82 mmol), 2,2,5-trimetil[1,3-dioxano]-5-carboxilato de vinilo (244 mg, 1,22 mmol), lipasa PS-C "Amano" II (720 mg) y tamices moleculares de 0,5 nm (250 mg) en *terc*-butil metil éter anhidro (3,5 ml) hasta 43°C bajo una atmósfera de argón. Después de 48 h, la monitorización por LC/MS mostró una conversión completa del material de partida. Se añadió THF (10 ml) y se filtró la mezcla a través de una almohadilla de Celite. Se lavó la enzima con THF (2 x 10 ml) y se concentraron los extractos orgánicos combinados a presión reducida. Se disolvió el residuo en THF (50 ml) y se añadió H_2SO_4 (15 ml, 0,5 N). Se dejó que la solución reposara a temperatura ambiente durante 5 h y se apagó luego la reacción por adición de NaHCO_3 (50 ml, 5%) y solución salina saturada (50 ml). Se extrajo la mezcla acuosa con EtOAc (3 x 100 ml) y se secaron los extractos orgánicos combinados sobre MgSO_4 . La eliminación de los solventes dio el producto como un semisólido. La purificación por cromatografía instantánea (hexano/acetona 1:1) dio el producto como un sólido incoloro.

Los datos de RMN son idénticos a los del ejemplo 2,4.

MS (ESI) m/z 1022 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. La fragmentación del aducto de sodio dio iones a m/z 850, 728, 693, 614, 560, 545, 441 y 431 según el patrón de fragmentación mostrado en la Figura 3.

Ejemplo 5: 39-Desmetoxi-40-O-[2-hidroxietyl]rapamicina

Se calentó una mezcla de 39-desmetoxi-40-O-(2-hidroxi)etylrapamicina (40 mg, 0,04 mmol), 2,2,5-trimetil[1,3-dioxano]-5-carboxilato de vinilo (25 mg, 0,13 mmol), lipasa PS-C "Amano" II (40 mg) y tamices moleculares de 0,5 nm (40 mg) en *tert*-butil metil éter anhidro (2 ml) hasta 43°C bajo una atmósfera de argón. Después de 72 h, la monitorización por LC/MS mostró una conversión completa del material de partida. Se añadió THF (10 ml) y se filtró la mezcla a través de una almohadilla de Celite. Se lavó la enzima con THF (2 x 10 ml) y se concentraron los extractos orgánicos combinados a presión reducida. Se disolvió el residuo en acetona (7,5 ml) y se añadió H₂SO₄ (2,5 ml, 0,5 N). Se dejó que la solución reposara a temperatura ambiente durante 2 h y se apagó luego la reacción por adición de NaHCO₃ sat. (10 ml) y agua (10 ml). Se extrajo la mezcla acuosa con EtOAc (3 x 10 ml) y se secaron los extractos orgánicos combinados sobre MgSO₄. La eliminación de los solventes dio el producto como un sólido amarillento. La purificación por HPLC preparatoria en una columna Phenomenex 21,2 x 50 mm Luna 5 µm C18 BDS usando un gradiente de 70:30 MeCN/agua a 100% MeCN a lo largo de 15 min dio el producto como un sólido incoloro.

MS (ESI) m/z 1067 [M+Na]⁺. La fragmentación del aducto de sodio dio iones a m/z 894, 772, 738, 614, 604, 589, 475 y 441 según el patrón de fragmentación mostrado en la Figura 4.

Ejemplo 6: 27-O-Desmetil-39-desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroxietyl)propionil]rapamicina

6.1 27-O-Desmetil-39-desmetoxirrapamicina, 40-éster con ácido 2,2,5-trimetil[1,3-dioxano]-5-carboxílico

Se calentó una mezcla de 27-O-desmetil-39-desmetoxirrapamicina (30 mg, 0,034 mmol), 2,2,5-trimetil[1,3-dioxano]-5-carboxilato de vinilo (34 mg, 0,17 mmol), lipasa PS-C "Amano" II (30 mg) y tamices moleculares de 0,5 nm (30 mg) en *tert*-butil metil éter anhidro (2 ml) hasta 43°C bajo una atmósfera de argón durante 72 h. Se añadió THF (10 ml) y se filtró la mezcla a través de una almohadilla de Celite. Se lavó la enzima con THF (2 x 10 ml) y se concentraron los extractos orgánicos combinados a presión reducida, para obtener un semisólido amarillento. La purificación por cromatografía instantánea usando hexano:acetona (v:v 2:1) dio el producto como un sólido amarillo claro.

MS (ESI) m/z 1049 [M+Na]⁺.

6.2 27-O-Desmetil-39-desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroxietyl)propionil]rapamicina

Se disolvió el material de 6,1 en acetona (6 ml) y se añadió H₂SO₄ (2 ml, 0,5 N). Se dejó que la solución reposara a temperatura ambiente durante 2 h y se apagó luego la reacción por adición de NaHCO₃ sat. (10 ml) y agua (10 ml). Se extrajo la mezcla acuosa con EtOAc (3 x 10 ml) y se secaron los extractos orgánicos combinados sobre MgSO₄. La eliminación de los solventes dio el producto como un sólido amarillento. La purificación por HPLC preparatoria en una columna Phenomenex 21,2 x 50 mm Luna 5 µm C18 BDS usando un gradiente de 70:30 MeCN/agua a 100% MeCN a lo largo de 15 min dio el producto como un sólido incoloro.

MS (ESI) m/z 1009 [M+Na]⁺. La fragmentación del aducto de sodio dio iones a m/z 836, 679, 600, 560, 531, 431, 427 según el patrón de fragmentación mostrado en la Figura 5. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 4,73 (m, 1 H, C(40)-H), 4,32 (d, J=4,5 Hz, 1 H, C(27)-H), 4,19 (d, J=4,5 Hz, 1 H, C(28)-H), 3,89 (m, 2 H), 3,70 (m, 2 H), 1,03 (s, 3 H).

Ejemplo 7. Evaluación *in vitro* de la actividad anticancerosa de 39-desmetoxi-40-O-(2-hidroxi)etylrapamicina y 39-desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroxietyl)propionil]rapamicina

Se realizó la evaluación *in vitro* de la 39-desmetoxi-40-O-(2-hidroxi)etylrapamicina y de la 39-desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroxietyl)propionil]rapamicina en cuanto a actividad anticancerosa en un panel de 12 líneas celulares tumorales humanas, en un ensayo de proliferación en monocapa como se describe en el Protocolo 1 en los procedimientos generales anteriores usando un ensayo con yoduro de propidio modificado.

En la siguiente Tabla 3 se muestran los resultados; cada resultado representa la media de experimentos por duplicado. La Tabla 4 muestra la CI₅₀ y la CI₇₀ medias para los compuestos en las líneas celulares estudiadas, mostrando la rapamicina como referencia.

Tabla 3

Línea celular	Crecimiento celular (Ensayo/Control (%)) a la concentración del fármaco							
	Rapamicina		39-Desmetoxi-40-O-(2-hidroxi)etilirrapamicina		39-Desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroximetil)propionil]rapamicina			
	1 μ M	10 μ M	1 μ M	10 μ M	1 μ M	10 μ M	1 μ M	10 μ M
SF268	53,5	46	63	7	62,5			12
251L	75,5	40	90	31	85,5			13
H460	67	66	76	25	66			12
MCF7	68,5	26,5	77	10	67			9
MDA231	67	63,5			70,5			13,5
MDA468	56,5	32			66			9
394NL	45	44	55	6	46			13
OVCAR3	69	69,5	85	9	73,5			39
DU145	50,5	54	56	7	62,5			13,5
LNCAP	61	34	49	18	48,5			20,5
A498	58,5	48,5			66			19,5
1138L	42	21,5	59	4	50			7,5

Tabla 4

	Rapamicina	39-desmetoxi-40-O-(2- hidroxietil)etil rapamicina	39-desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroximetil)propionil]rapamicina
Cl ₅₀ media (microM)	3,5	2,2*	2,0
Cl ₇₀ media (microM)	9,1	5,513*	4,5
* - la media se basaba en las 9 líneas celulares para las que había datos disponibles.			

Ejemplo 8: Ensayos de unión *in vitro*

FKBP12

5 FKBP12 se despliega reversiblemente en el desnaturalizante químico clorhidrato de guanidinio (GdnHCl) y se puede monitorizar el desplegamiento por el cambio en la fluorescencia intrínseca de la proteína (Main y col., 1998). Los ligandos que se unen específicamente a FKBP12 y estabilizan su estado nativo cambian la curva de desnaturalización, de tal forma que la proteína se despliega a mayores concentraciones de desnaturalizante químico (Main y col., 1999). A partir de la diferencia en estabilidad, se puede determinar la constante de unión a ligando
10 usando la ecuación 1,

$$\Delta G_{app} = \Delta G_{D-N}^{H_2O} + RT \ln \left(1 + \frac{[L]}{K_d} \right) \quad (1)$$

en la que ΔG_{app} es la diferencia aparente en la energía libre del desplegamiento entre formas libres y unidas a ligando, $\Delta G_{D-N}^{H_2O}$ es la energía libre del desplegamiento en agua de la proteína libre, [L] es la concentración de ligando y K_d es la constante de disociación para el complejo proteína-ligando (Meiering y col., 1992). La energía libre del desplegamiento puede ser relacionada con el punto medio de la transición del desplegamiento usando la
15 siguiente ecuación:

$$\Delta G_{D-N}^{H_2O} = m_{D-N} [D]_{50\%} \quad (2)$$

en la que m_{D-N} es una constante para una proteína dada y un desnaturalizante dado y que es proporcional al cambio en el grado de exposición de los residuos en el desplegamiento (Tanford 1968 y Tanford 1970), y $[D]_{50\%}$ es la
20 concentración de desnaturalizante correspondiente al punto medio del desplegamiento. Definimos $\Delta \Delta G_{D-N}^L$, la diferencia en la estabilidad de FKBP12 con rapamicina y ligando desconocido (a la misma concentración de ligando), como:

$$\Delta \Delta G_{D-N}^L = \langle m_{D-N} \rangle \Delta [D]_{50\%} \quad (3)$$

en la que $\langle m_{D-N} \rangle$ es el valor medio de m de la transición del desplegamiento y $\Delta [D]_{50\%}$ la diferencia en los puntos medios para la transición del desplegamiento rapamicina-FKBP12 y la transición del desplegamiento complejo
25 ligando desconocido-FKBP12. En condiciones en las que $[L] > K_d$, entonces, $\Delta \Delta G_{D-N}$, puede ser relacionado con las K_d relativas de los dos compuestos mediante la ecuación 4:

$$\Delta \Delta G_{D-N}^L = RT \ln \frac{K_d^X}{K_d^{rap}} \quad (4)$$

en la que K_d^{rap} es la constante de disociación para la rapamicina y K_d^X es la constante de disociación para el ligando
30 desconocido X. Por lo tanto,

$$K_d^X = K_d^{rap} \exp \left(\frac{\langle m_{D-N} \rangle \Delta [D]_{50\%}}{RT} \right) \quad (5)$$

El ajuste de cada curva de desnaturalización genera valores para m_{D-N} y $[D]_{50\%}$, que pueden ser usados para calcular un valor medio de m, $\langle m_{D-N} \rangle$, y $\Delta [D]_{50\%}$, y por ello K_d^X . Se usa el valor en la literatura de K_d^{rap} de 0,2 nM.

En algunos casos, debido a la baja solubilidad del compuesto de ensayo, se usaron menores concentraciones del

compuesto de ensayo que en el experimento de control de la rapamicina. En estos casos se tomaron en cuenta las diferencias entre la concentración del compuesto de ensayo y la concentración del control de rapamicina usando la siguiente ecuación 6:

$$K_d^X = K_d^{rap} \frac{(1+[L]_x)}{(1+[L]_{rap})} \exp\left(\frac{< m_{D-N} > \Delta[D]_{50\%}}{RT}\right) \quad (6)$$

5

Tabla 5 - Resultados del ensayo de unión *in vitro* de FKBP-12

	Ligando [L] μ M	FKBP12 K_d (nM)
Rapamicina	10	0,2
39-Desmetoxi-40-O-(2-hidroxi)etilrapamicina	1,6	3,7
39-Desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroximetil)propionil]rapamicina	6,67	1,1

mTOR

Se estableció la inhibición de mTOR indirectamente por medición del nivel de fosforilación de los marcadores sustitutos de la ruta mTOR y p70S6 kinasa y S6 (Brunn y col., 1997; Mothe-Satney y col., 2000; Tee y Proud, 2002; Huang y Houghton, 2002).

Se cotransfectaron células HEK293 con mTOR marcado con FLAG y Raptor marcado con myc, se cultivaron durante 24 h y se privaron luego de suero durante la noche. Las células fueron estimuladas con 100 nM de insulina y luego recogidas y lisadas por 3 ciclos de congelación/descongelación. Se juntaron los lisados y se inmunoprecipitaron cantidades iguales con anticuerpo FLAG para el complejo mTOR/Raptor. Se procesaron los inmunoprecipitados: las muestras tratadas con compuesto (de 0,00001 a 0,003 mM) fueron preincubadas durante 30 min a 30°C con FKBP12/rapamicina, FKBP12/derivado 39-desmetoxirrapamicina o vehículo (DMSO), y las muestras no tratadas fueron incubadas en tampón kinasa. Se sometieron entonces los inmunoprecipitados a un ensayo de kinasa *in vitro* en presencia de 3 mM ATP, 10 mM Mn_2^+ y GST-4E-BP1 como sustrato. Se detuvieron las reacciones con tampón de muestra 4x y luego se sometieron a 15% SDS-PAGE, se transfirieron en húmedo a una membrana de PVDF y se sondearon luego en cuanto a fosfo-4E-BP1 (T37/46). Se cuantificaron las bandas del Western blot por análisis de imagen usando Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). La Figura 6A muestra las curvas de dosis-respuesta para la rapamicina (cuadrados rellenos) y la 39-desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroximetil)propionil]rapamicina (triángulos rellenos). La Figura 6B muestra las curvas de dosis-respuesta para la rapamicina (cuadrados rellenos) y la 39-desmetoxi-40-O-(2-hidroxi)etilrapamicina (triángulos rellenos).

De manera alternativa, se sembraron células HEK293 en placas de 6 pocillos y se preincubaron durante 24 h y se les privó después de suero durante la noche. Se pretrataron las células con vehículo o compuesto durante 30 min a 30°C, se las estimuló después con 100 nM de insulina durante 30 min a 30°C y se lisaron por medio de 3 ciclos de congelación/descongelación y se estudiaron en cuanto a la concentración de proteína. Se cargaron cantidades iguales de proteína y se separaron en geles de SDS-PAGE. Se transfirió la proteína en húmedo a una membrana de PVDF y luego se la sondeó en cuanto a fosfo-S6 (S235/36) o fosfo-p70 S6K (T389). Se cuantificaron las bandas del Western blot por análisis de imagen usando Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Referencias

- Alarcón, C.M., Heitman, J., and Cardenas, M.E. (1999) Protein kinase activity and identification of a toxic effector domain of the target of rapamycin TOR proteins in yeast. *Molecular Biology of the Cell* 10: 2531-2546.
- Álvarez, M., Paull, K., Monks, A., Hose, C., Lee, J.S., Weinstein, J., Grever, M., Bates, S., Fojo, T., 1995. Generation of a drug resistance profile by quantitation of mdr-1/P-glycoprotein in the cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen. *Journal of Clinical Investigation*, 95, 2205-2214.
- Aparicio, J.F., Molnár, I., Schwecke, T., König, A., Haydock, S.F., Khaw, L.E., Staunton, J., and Leadlay, P.F. (1996) Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene* 169: 9-16.
- Baker, H., Sidorowicz, A., Sehgal, S.N., and Vézina, C. (1978) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. III. In vitro and in vivo evaluation. *Journal of Antibiotics* 31: 539-545.
- Boulay, A., Zumstein-Mecker, S., Stephan, C., Beuvink, I., Zilbermann, F., Haller, R., Tobler, S., Heusser, C., O'Reilly, T., Stolz, B., Marti, A., Thomas, G., Lane, H.A., 2004, Antitumor efficacy of intermittent treatment schedules with the rapamycin derivative RAD001 correlates with prolonged inactivation of ribosomal protein S6 kinase 1 in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Res.* 64(1), 252-61.
- Boyd, M.R. and Paull, K.D., 1995. Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. *Drug Development Research* 34, 91-109,

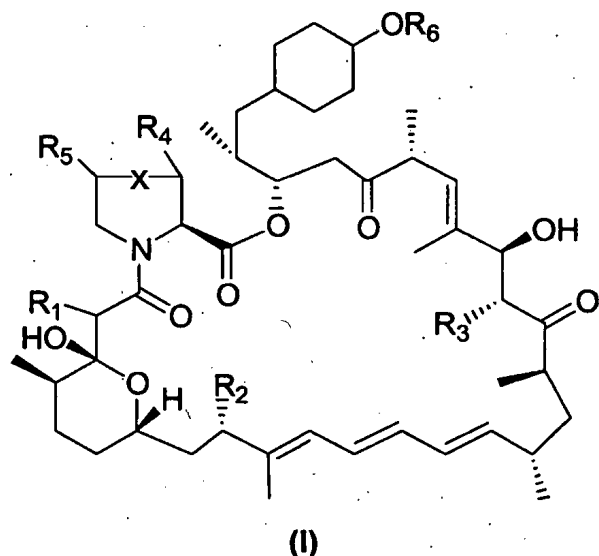
- Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S., and Schreiber, S.L. (1994) A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369: 756-758.
- 5 Brunn, G.J., Fadden, P., Haystead, T.A., Lawrence, J.C. Jr. 1997 The mammalian target of rapamycin phosphorylates sites having a (Ser/Thr)-Pro motif and is activated by antibodies to a region near its COOH terminus. *J Biol. Chem.* 272(51), 32547-32550.
- Brunn, G.J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence, J.C., and Abraham, R.T. (1996) Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO Journal* 15: 5256-5267.
- 10 Carlson, R.P., Hartman, D.A., Tomchek, L.A., Walter, T.L., Lugay, J.R., Calhoun, W., Sehgal, S.N., Chang, J.Y. (1993). Rapamycin, a potential disease-modifying antiarthritic drug. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266(2):1125-38.
- Crowe A, Bruelisauer A, Duerr L, Guntz P, Lemaire M. (1999) Absorption and intestinal metabolism of SDZ-RAD and rapamycin in rats. *Drug Metab Dispos*, 27(5), 627-32 Dengler W.A., Schulte J., Berger D.P., Mertelsmann R. and Fiebig HH. (1995) Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assay. *Anti-Cancer Drugs*, 6:522-532.
- 15 DiLella, A.G., and Craig, R.J. (1991) Exon organization of the human FKBP-12 gene: correlation with structural and functional protein domains. *Biochemistry* 30: 8512-8517.
- Dudkin, L., Dilling, M.B., Cheshire, P.J., Harwood, F.C., Hollingshead, M., Arbuck, S.G., Travis, R., Sausville, E.A., Houghton, P.J. (2001). Biochemical correlates of mTOR inhibition by the rapamycin ester CCI-779 and tumor growth inhibition. *Clin. Cancer Res.* 7(6):1758-64
- 20 Evans D.A., Gage J.R. and Leighton J.L. (1992) Assymmetric synthesis of calyculin A. 3. Assemblage of the calyculin skeleton and the introduction of a new phosphate monoester synthesis. *J. Org. Chem.*, 57:1964-1966
- Fiebig H.H., Dengler W.A. and Roth T. (1999) Human tumor xenografts: Predictivity, characterization, and discovery of new anticancer agents. In: Fiebig HH, Burger AM (eds). *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development*. Contrib. Oncol., 54: 29 - 50.
- 25 Findlay J.A, and Radics, L. (1980) *Canadian Journal of Chemistry* 58:579.
- Fishbein, T.M., Florman, S., Gondolesi, G., Schiano, T., LeLeiko, N., Tschernia, A., Kaufman, S. (2002). Intestinal transplantation before and after the introduction of sirolimus. *Transplantation*. 73(10): 1538-42.
- 30 Foey, A., Green, P., Foxwell, B., Feldmann, M., Brennan, F. (2002). Cytokine-stimulated T cells induce macrophage IL-10 production dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and p70S6K: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 4(1):64-70. Epub 2001 Oct 10.
- Furniss B.S., Hannaford A.J., Smith P.W.G. and Tatchell A.R. (1989) *Vogel's textbook of practical organic chemistry*, 5th Ed, Pearson, Prentice Hall, Harlow, UK.
- 35 Gallant-Haidner HL, Trepanier DJ, Freitag DG, Yatscoff RW. 2000, "Pharmacokinetics and metabolism of sirolimus". *Ther Drug Monit.* 22(1), 31-5.
- Grass, G.M., Rubas, W., Jezyk, N., (1992) Evaluation of CACO-2 monolayers as a predictor of drug permeability in colonic tissues. *FASEB Journal*, 6, A1002.
- 40 Gregory, C.R., Huie, P., Billingham, M.E. and Morris, R.E. (1993). Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. Its effect on cellular, growth factor and cytokine response in injured vessels. *Transplantation* 55(6):1409-1418.
- Gregory MA, Gaisser S, Lill RE, Hong H, Sheridan RM, Wilkinson B, Petkovic H, Weston AJ, Carletti I, Lee HL, Staunton J, Leadlay PF. (2004) "Isolation and characterization of pre-rapamycin, the first macrocyclic intermediate in the biosynthesis of the immunosuppressant rapamycin by *S. hygroscopicus*". *Angew Chem Int Ed Engl.* 43(19), 2551-3
- 45 Gu, J, Ruppen ME, Cai P. (2005), "Lipase-Catalyzed Regioselective Esterification of Rapamycin: Synthesis of Temsirolimus (CCI-779). *Org. Lett.* 7(18): 3945-3948.
- 50 Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C.J., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, M., Jauch, K.W., and Geissler, E.K. (2002) Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine* 8: 128-135.
- Hardwick, J.S., Kuruvilla, F.G., Tong, J.K., Shamji, A.F., and Schreiber, S.L. (1999) Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 14866-14870.
- 55 Hentges, K.E., Sirry, B., Gingeras, A.C., Sarbassov, D., Sonenberg, N., Sabatini, D., and Peterson, A.S. (2001) FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13796-13801.
- Huang, S. and Houghton, P.J., 2002. Mechanisms of resistance to rapamycins. *Drug Resist. Update*, 4(6), 378-391.
- 60 Jain, S., Bicknell, G.R., Whiting, P.H., Nicholson, M.L. (2001). Rapamycin reduces expression of fibrosis-associated genes in an experimental model of renal ischaemia reperfusion injury. *Transplant Proc.* 33(1-2):556-8.
- Kahan, B.D., and Camardo, J.S. (2001) Rapamycin: Clinical results and future opportunities. *Transplantation* 72:1181-1193.
- 65 Kahan, B.D., Chang, J.Y., and Sehgal, S.N. (1991) Preclinical evaluation of a new potent immunosuppressive agent, rapamycin. *Transplantation* 52: 185-191.

- Kirby, B., and Griffiths, C.E.M. (2001) Psoriasis: the future. *British Journal of Dermatology* 144:37-43.
- Kirchner, G.I., Winkler, M., Mueller L., Vidal, C., Jacobsen, W., Franzke, A., Wagner, S., Blick, S., Manns M.P., and Sewing K.-F. (2000) Pharmacokinetics of SDZ RAD and cyclosporin including their metabolites in seven kidney graft patients after the first dose of SDZ RAD. *British Journal of Clinical Pharmacology* 50:449-454.
- 5 Kuo, C.J., Chung, J.K., Fiorentino, D.F., Flanagan, W.M., Blenis, J., and Crabtree, G.R. (1992) Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature* 358: 70-73.
- Langmann T, Mauerer R, Zahn A, Moehle C, Probst M, Stremmel W, Schmitz G. (2003) "Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues". *Clin Chem.* 49(2), 230-8.
- 10 Lee, J-S, Paull, K., Álvarez, M., Hose, C., Monks, A., Grever, M., Fojo, A.T., Bates, S.E., 1994. Rhodamine efflux patterns predict P-glycoprotein substrates in the National Cancer Institute drug screen. *Molecular Pharmacology* 46,627-638.
- Li, A.P. (1992) Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 6, 357-366.
- 15 Lowden, P. A. S., (1997) Ph.D. Dissertation, University of Cambridge. "Studies on the biosynthesis of rapamycin".
- Lyons, W.E., George, E.B., Dawson, T.M., Steiner, J.P., and Snyder, S.H. (1994) Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:3191-3195.
- 20 Main, E. R. G., Fulton, K. F. & Jackson, S. E. (1998). The Context-Dependent Nature of Destabilising Mutations on The Stability of FKBP12. *Biochemistry* 37, 6145-6153.
- Main, E. R. G., Fulton, K. F. & Jackson, S. E. (1999a). Folding of FKBP12: Pathway of Folding and Characterisation of the Transition State. *J. Mol. Biol.* 291, 429-444.
- McAlpine, J. B., Swanson S. J., Jackson, M., Whittern, D.N. (1991). Revised RMN assignments for rapamycin. *Journal of Antibiotics* 44: 688-690.
- 25 Meiering, E. M., Serrano, L. & Fersht, A. R. (1992). Effect of Active Site Residues in Barnase on Activity and Stability. *J. Mol. Biol.* 225, 585-589.
- Morice, M.C., Serruys, P.W., Sousa, J.E., Fajadet, J., Ban Hayashi, E., Perin, M., Colombo, A., Schuler, G., Barragan, P., Guagliumi, G., Molnar, F., Falotico, R. (2002). RAVEL Study Group. Randomized Study with the Sirolimus-Coated Bx Velocity Balloon-Expandable Stent in the Treatment of Patients with de Novo Native Coronary Artery Lesions. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N. Eng. J. Med.* 346(23):1773-80.
- 30 Mothe-Satney, I., Brunn, G.J., McMahon, L.P., Capaldo, C.T., Abraham, R.T., Lawrence, J.C. Jr-. 2000 Mammalian target of rapamycin-dependent phosphorylation of PHAS-I in four (S/T)P sites detected by phospho-specific antibodies. *J Biol Chem.* 275(43), 33836-33843.
- Mykатыn, T.M., Ellis, R.A., Grand, A.G., Sen, S.K., Lowe, J.B. 3rd, Hunter, D.A., Mackinnon, S.E. (2002). The effects of rapamycin in murine peripheral nerve isografts and allografts. *Plast. Reconstr. Surg.* 109(7):2405-17.
- 40 Navé, B.T., Ouwens, D.M., Withers, D.J., Alessi, D.R., and Sheperd, P.R. (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino acid deficiency on protein translation. *Biochemical Journal* 344:427-431.
- NCCLS Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Yeasts: Approved Standard M27- A, vol. 17 No. 9. (1997).
- 45 Paiva, N.L., Demain, A.L., and Roberts, M.F. (1991) Incorporation of acetate, propionate, and methionine into rapamycin By *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Natural Products* 54: 167-177.
- Paiva, N.L., Demain, A.L., and Roberts, M.F. (1993) The immediate precursor of the nitrogen-containing ring of rapamycin is free pipercolic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 581-585.
- Perin, E C, (2005), "Choosing a Drug-Eluting Stent: A Comparison Between CYPHER and TAXUS", *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 6 (suppl 1), ppS13-S21.
- 50 Persidis A. (1999), "Cancer multidrug resistance" *Nat Biotechnol.* 17: 94-5
- Powell, N., Till, S., Bungre, J., Corrigan, C. (2001). The immunomodulatory drugs cyclosporin A, mycophenolate mofetil, and sirolimus (rapamycin) inhibit allergen-induced proliferation and IL-5 production by PBMCs from atopic asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108(6):915-7
- 55 Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., Shapiro, A.M., Rajotte, R.V., Power, R. (2002). Combination therapy with sirolimus and interleukin-2 prevents spontaneous and recurrent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 51(3):638-45.
- Raught, B., Gingras, A.C., and Sonenberg, N. (2001) The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 7037-7044.
- 60 Reather, J. A., (2000), Ph.D. Dissertation, University of Cambridge. "Late steps in the biosynthesis of macrocyclic lactones".
- Reitamo, S., Spuls, P., Sassolas, B., Lahfa, M., Claudy, A., Griffiths, C.E.; Sirolimus European Psoriasis Study Group. (2001). Efficacy of sirolimus (rapamycin) administered concomitantly with a subtherapeutic dose of cyclosporin in the treatment of severe psoriasis: a randomized controlled trial. *Br. J. Dermatol.* 145(3):438-45.
- 65 Roth T., Burger A.M., Dengler W., Willmann H. and Fiebig H.H. (1999) Human tumor cell lines demonstrating the characteristics of patient tumors as useful models for anticancer drug screening. In: Fiebig HH, Burger AM (eds).

- Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development. *Contrib. Oncol.*, 54: 145 - 156.
- Roymans, D., and Slegers, H. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *European Journal of Biochemistry* 268:487-498.
- 5 Schwecke, T., Aparicio, J.F., Molnár, I., König, A., Khaw, L.E., Haydock, S.F., Oliynyk, M., Caffrey, P., Cortés, J., Lester, J.B., Böhm, G.A., Staunton, J., and Leadlay, P.F. (1995) The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 7839-7843.
- Sedrani, R., Cottens, S., Kallen, J., and Schuler, W. (1998) Chemical modifications of rapamycin: the discovery of SDZ RAD. *Transplantation Proceedings* 30: 2192-2194.
- 10 Sehgal, S.N., Baker, H., and Vézina, C. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics* 28: 727-733.
- Shepherd, P.R., Withers, D.J., and Siddle K. (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochemical Journal* 333: 471-490.
- 15 Smith M.B. and March J. (2001) *March's advanced organic chemistry*, 5th Ed, John Wiley and Sons Inc., UK
- Steiner, J.P., Hamilton, G.S., Ross, D. T., Valentine, H.L., Guo, H., Connolly, M.A., Liang, S., Ramsey, C., Li, J.-H.J., Huang, W., Howorth, P., Soni, R., Fuller, M., Sauer, H., Nowotnik, A.C., and Suzdak, P.D. (1997) Neutrophilic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:2019-2024.
- 20 Stein U, Jurchott K, Schlafke M, Hohenberger P. (2002) "Expression of multidrug resistance genes MVP, MDR1, and MRP1 determined sequentially before, during, and after hyperthermic isolated limb perfusion of soft tissue sarcoma and melanoma patients". *J Clin Oncol.* 20(15):3282-92.
- Szakacs G, Annereau JP, Lababidi S, Shankavaram U, Arciello A, Bussey KJ, Reinhold W, Guo Y, Kruh GD, Reimers M, Weinstein JN, Gottesman MM. 2004, "Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells". *Cancer Cell.* 6(2):129-37.
- 25 Tanford, C. (1968). *Protein Denaturation*. *Adv. Prot. Chem.* 23, 121-282.
- Tanford, C. (1970). *Protein Denaturation*. Part C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Advances in Protein Chemistry* 24, 1-95
- Tang, S.J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A.-C., Sonenberg, N., and Schuman, E.M. (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1:467-472.
- 30 Tee, A.R. and Proud, C.G. 2002 Caspase cleavage of initiation factor 4E-binding protein 1 yields a dominant inhibitor of Cap-dependent translation and reveals a novel regulatory motif. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1674-1683
- Toshima K. and Tatsuta K. (1993) Recent progress in O-glycosylation methods and its application to natural product synthesis. *Chem. Rev.*, 93:1503-1531.
- 35 Trepanier DJ, Gallant H, Legatt DF, Yatscoff RW. (1998), "Rapamycin: distribution, pharmacokinetics and therapeutic range investigations: an update". *Clin Biochem.* 31(5):345-51.
- Vézina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S.N. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of Antibiotics* 28: 721-726.
- 40 Volpe, D.A., Faustino, P.J., Yu, L.X., (2001) Towards standardisation of an in vitro method of drug absorption. *Pharmacopeial Forum*, 27, 2916-2922.
- Waller, J.R., and Nicholson, M.L. (2001) Molecular mechanisms of renal allograft fibrosis. *British Journal of Surgery* 88:1429-1441.
- 45 Warner, L.M., Adams, L.M., Chang, J.Y., Sehgal, S.N. (1992). A modification of the in vivo mixed lymphocyte reaction and rapamycin's effect in this model. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 64(3):242-7.
- Yu, K., Toral-Barza, L., Discafani, C., Zhang, W.G., Skotnicki, J., Frost, P., Gibbons, J.J. (2001) mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. *Endocrine- Related Cancer* 8:249-258.
- 50 Zhu, J., Wu J., Frizell, E., Liu, S.L., Bashey, R., Rubin, R., Norton, P., Zern, M.A. (1999). Rapamycin inhibits hepatic stellate cell proliferation in vitro and limits fibrogenesis in an in vivo model of liver fibrosis. *Gastroenterology.* 117(5):1198-204.

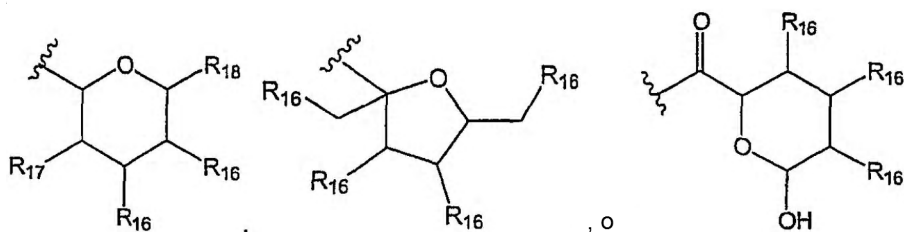
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto según la Formula (I) siguiente:



en la que:

- 5 X representa un enlace o CH₂;
 R₁ representa un grupo ceto o (H,H);
 R₂ representa OH u OMe;
 R₃ representa H, OH u OMe;
 R₄ y R₅ representa cada uno independientemente H u OH;
 10 R₆ representa -R₇, -C(O)R₇, -(CH₂)₂-O-[CR₂₁R₂₂-O]_a-C(O)-R₂₃, -CR₂₁R₂₂-O-C(O)-R₂₃, -POR₁₉R₂₀,
 -PO(OR₁₉)(OR₂₀) o Y-R₁₅;
 R₇ representa -(CR₈R₉)_m(CR₁₀R₁₁)_pCR₁₂R₁₃R₁₄;
 R₈ y R₉ representa cada uno independientemente alquilo C1-C4, alqueno C2-C4 o alquino C2-C4, pudiendo
 estar cualquiera de estos grupos opcionalmente sustituido con -PO(OH)₂, -CF₂PO(OH)₂, -OH, -COOH o -NH₂; o
 15 R₈ y R₉ representan cada uno independientemente H, trifluorometilo o F;
 R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃ y R₁₄ representa cada uno independientemente alquilo C1-C4, alqueno C2-C4 o alquino C2-
 C4, pudiendo estar cualquiera de estos grupos opcionalmente sustituido con -PO(OH)₂, -CF₂PO(OH)₂, -OH, -
 COOH o -NH₂; o R₁₀, R₁₁, R₁₂, R₁₃ y R₁₄ pueden ser independientemente seleccionados entre H, -(CR₈R₉)_qNH₂, -
 (CR₈R₉)_qOH, CF₃, F, COOH; o R₁₀ y R₁₁ o R₁₂ y R₁₃ o R₁₃ y R₁₄ pueden ser tomados junto con el carbono al que
 20 están unidos para formar un C3-C6 cicloalquilo o un anillo de heteroalquilo de 3 a 6 miembros que contiene uno
 o más heteroátomos seleccionados entre N, O y S y que está opcionalmente sustituido con hasta 5 grupos -
 (CR₈R₉)_qOH, -(CR₈R₉)_qNH₂ o COOH;
 Y = enlace, -C(O)-O-, -(CH₂)₂-O-C(O)-O-;
 R₁₅ representa



- 25 los R₁₆ son cada uno independientemente H u OH;
 R₁₇ es independientemente seleccionado entre H, OH y NH₂;
 R₁₈ es independientemente seleccionado entre H, -CH₃, -CH₂OH y -COOH;
 con la condición, sin embargo, de que no más de 2 grupos seleccionados entre R₁₆, R₁₇ y R₁₈ representen H o
 30 CH₃;
 R₁₉ y R₂₀ representa cada uno independientemente H o C1-C4 alquilo, o R₁₉ y R₂₀ representan juntos =CH₂;
 R₂₁ es independientemente seleccionado entre H, CH₃;
 R₂₂ es independientemente seleccionado entre H, -CH₃, -CH=CH₂, -CH₂Cl, -CHCl₂, -CCl₃, -CH(OH)Me, -CH₂OH,
 -CH₂CH₃, -CH(Cl)Me;

R_{23} es independientemente R_7 , $Y-R_{15}$ o un anillo de arilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con entre uno y tres grupos seleccionados entre OH, F, Cl, Br, NO_2 y NH_2 ;
a representa 0 o 1;

m, p y q representa cada uno independientemente un número entero de 0-4;

- 5 con la condición, sin embargo, de que el resto R_7 no contenga más de 12 átomos de carbono y sí contiene al menos un grupo funcional seleccionado entre $-PO(OH)_2$, $-CF_2PO(OH)_2$, $-COOH$, OH o NH_2 ;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. Un compuesto según la reivindicación 1 en el que R_6 representa $-R_7$.
3. Un compuesto según la reivindicación 1 en el que R_6 representa $-C(O)R_7$.
- 10 4. Un compuesto según la reivindicación 1 en el que R_6 representa $-(CH_2)_2-O-[CR_{21}R_{22}-O]_a-C(O)-R_{23}$.
5. Un compuesto según la reivindicación 4 en el que R_{23} representa R_7 .
6. Un compuesto según la reivindicación 4 en el que R_{23} representa $Y-R_{15}$.
7. Un compuesto según la reivindicación 1-5 en el que R_7 contiene 7 o menos átomos de carbono.
8. Un compuesto según la reivindicación 7, en el que R_7 contiene 5 o menos átomos de carbono.
- 15 9. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7 u 8 en el que R_7 contiene dos grupos seleccionados entre $-PO(OH)_2$, $-CF_2PO(OH)_2$, $-OH$, $-COOH$ y $-NH_2$.
10. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 9 en el que R_7 contiene al menos un grupo funcional seleccionado entre $-COOH$, OH y NH_2 .
11. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 10 en el que p representa 0 o 1.
- 20 12. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 11 en el que m representa 0 o 1.
13. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 12 en el que q representa 0, 1 o 2.
14. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 13 en el que R_{11} representa H.
15. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 14, en el que R_{12} representa H.
16. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 15, en el que R_{13} representa H o OH.
- 25 17. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 16 en el que p representa 1, y R_{10} representa Me, OH o CH_2OH .
18. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 16 en el que p representa 1 y R_{11} representa Me, H o CH_2OH .
- 30 19. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 10 en el que m y p representan ambos 0, R_{12} y R_{13} representan ambos H y R_{14} representa $-(CR_8R_9)_q-OH$ en el que q = 0 o 1 y R_8 y R_9 representan ambos H.
20. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 10 en el que p representa 1 y m representa 0, R_{10} y R_{11} representan ambos H, R_{12} representa H, R_{13} representa H, OH o NH_2 y R_{14} representa $-(CR_8R_9)_q-OH$ en el que q = 0 o 1 y R_8 y R_9 representan ambos H.
- 35 21. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 10 en el que R_6 representa el residuo derivado de la formación de un éster con ácido hidroxiacético, ácido 3-hidroxi-2,2-dimetilpropiónico, ácido 2,3-dihidroxi-2,2-dimetilpropiónico, ácido 3-hidroxi-2-hidroximetilpropiónico o ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico.
22. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o 7 a 10 en el que R_6 representa el residuo derivado de la formación de un éter con ácido hidroxiacético, ácido 3-hidroxi-2,2-dimetilpropiónico, ácido 2,3-dihidroxi-2,2-dimetilpropiónico, ácido 3-hidroxi-2-hidroximetilpropiónico o ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico.
- 40 23. Un compuesto según la reivindicación 1 que es 39-desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroximetil)propionil]rapamicina o una sal farmacéuticamente aceptable del misma.
24. Un compuesto según la reivindicación 1 que es 39-desmetoxi-40-O-(2-hidroxi)etilrapamicina o una sal farmacéuticamente aceptable del misma.
- 45 25. Un compuesto según la reivindicación 1 que es 39-desmetoxi-40-O-[2-hidroxi-3-hidroxi-2-(hidroximetil)-2-metilpropanoato]rapamicina o una sal farmacéuticamente aceptable del misma.

26. Un compuesto según la reivindicación 1 que es 27-O-desmetil-39-desmetoxi-40-O-[2,2-bis(hidroximetil)propionil]rapamicina o una sal farmacéuticamente aceptable del misma.

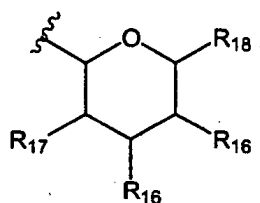
27. Un compuesto según la reivindicación 1 en el que R₆ representa -POR₁₉R₂₀.

28. Un compuesto según la reivindicación 1 en el que R₆ representa -PO(OR₁₉)(OR₂₀).

5 29. Un compuesto según la reivindicación 27 o 28 en el que R₁₉ y R₂₀ representan ambos CH₃ o representan ambos CH₂CH₃.

30. Un compuesto según la reivindicación 1 en el que R₆ representa Y-R₁₅.

31. Un compuesto según la reivindicación 30 en el que el grupo R₁₅ representa



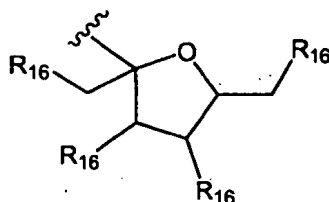
10 32. Un compuesto según la reivindicación 31 en el que R₁₅ es un resto formado por formación de un acetal con glucosa, glucosamina, ácido glucurónico o arabinosa.

33. Un compuesto según la reivindicación 31, en el que R₁₅ es un resto formado por formación de un acetal con D-glucosa.

15 34. Un compuesto según la reivindicación 31, en el que R₁₅ es un resto formado por formación de un acetal con D-glucosamina.

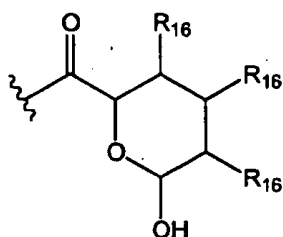
35. Un compuesto según la reivindicación 31, en el que R₁₅ es un resto formado por formación de un acetal con ácido D-glucurónico.

36. Un compuesto según la reivindicación 30 en el que R₁₅ representa:



20 37. Un compuesto según la reivindicación 36, en el que R₁₅ es un resto formado por formación de un acetal con fructosa.

38. Un compuesto según la reivindicación 30 en el que R₁₅ representa:



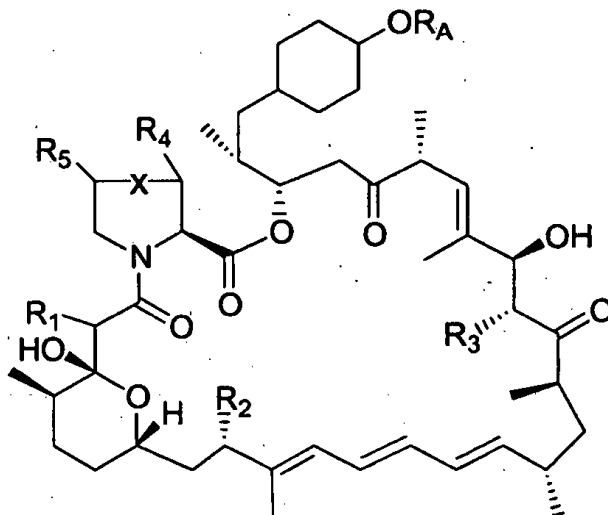
25 39. Un compuesto según la reivindicación 38, en el que R₁₅ es un resto formado por formación de un éster con ácido glucurónico.

40. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 39 en el que Y representa un enlace.

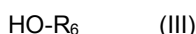
41. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 39 en el que Y representa -(CH₂)₂-O-C(O)-O-.

42. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 30 a 39 en el que Y representa - C(O)-O-.
43. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42 para su uso como producto farmacéutico.
44. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42 para su uso en el tratamiento del cáncer y/o de las malignidades de las células B, en la inducción o el mantenimiento de la inmunosupresión, en el tratamiento del rechazo de trasplantes, de la enfermedad del injerto contra el huésped, de trastornos autoinmunes, de enfermedades inflamatorias, de la enfermedad vascular y de enfermedades fibróticas, en la estimulación de la regeneración neuronal o en el tratamiento de infecciones fúngicas.
45. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42 para su uso como un producto farmacéutico en el tratamiento del cáncer o de las malignidades de las células B.
46. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42 junto con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
47. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer o de las malignidades de las células B.
48. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42 en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer y/o de las malignidades de las células B, en la inducción o el mantenimiento de la inmunosupresión, en el tratamiento del rechazo de trasplantes, de la enfermedad del injerto contra el huésped, de trastornos autoinmunes, de enfermedades inflamatorias, de la enfermedad vascular y de enfermedades fibróticas, en la estimulación de la regeneración neuronal o en el tratamiento de infecciones fúngicas.
49. El uso según la reivindicación 48 en el que el medicamento es para el tratamiento del cáncer o de las malignidades de las células B.
50. Un procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones a 42 que comprende:

(a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II):



- 25 en la que R_A representa H o (CH₂)₂-OH o un derivado protegido del mismo, con un compuesto de fórmula (III):



- 30 o un derivado activado del mismo en la que el grupo R₆ es como se ha definido anteriormente para los compuestos de fórmula (II) o un derivado protegido del mismo, o
- (b) convertir un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo en otro compuesto de fórmula (I) u otra sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o
- (c) desproteger un compuesto protegido de fórmula (I).

51. Una composición o kit de partes que comprende (i) un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42 y (ii) uno o más de otros agentes terapéuticamente efectivos.

52. La composición o kit de partes de la reivindicación 51 en el que el uno o más de otros agentes terapéuticamente efectivos son seleccionados entre el grupo de metotrexato, leukovorina, adriamicina, prednisona, bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina, vinorelbina, doxorubicina, tamoxifeno, toremifeno, acetato de megestrol, anastrozol, goserelina, anticuerpo monoclonal anti-HER2 (por ejemplo, Herceptin™), capecitabina, clorhidrato de raloxifeno, inhibidores de EGFR, inhibidores de VEGF, inhibidores de proteasomas, inhibidores de hsp90, azatioprina, corticosteroides, ciclofosfamida, ciclosporina A, FK506, micofenolato mofetilo, OKT-3, ATG, anfotericina B, flucitosina, equinocandinas, griseofulvina, un imidazol y un agente antifúngico triazólico.

10

Figura 1

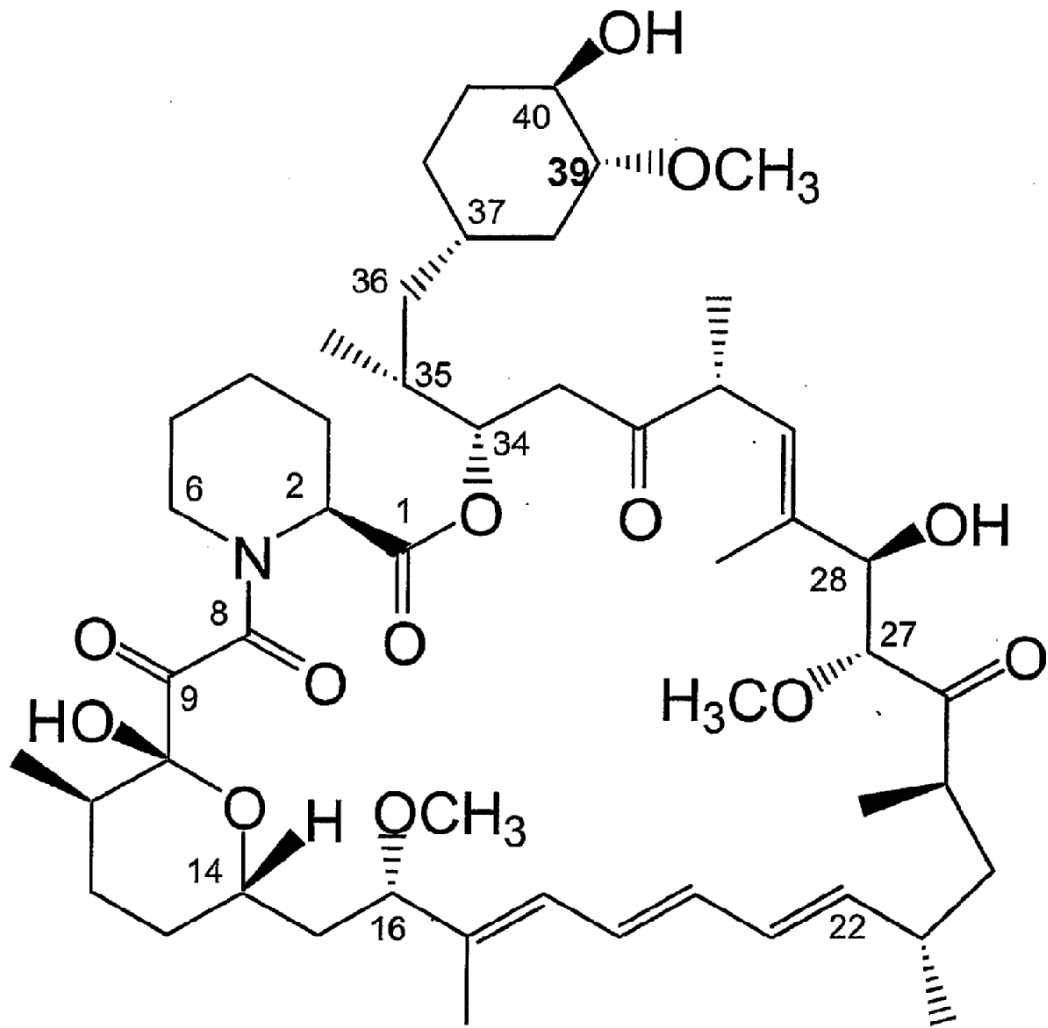


Figura 2

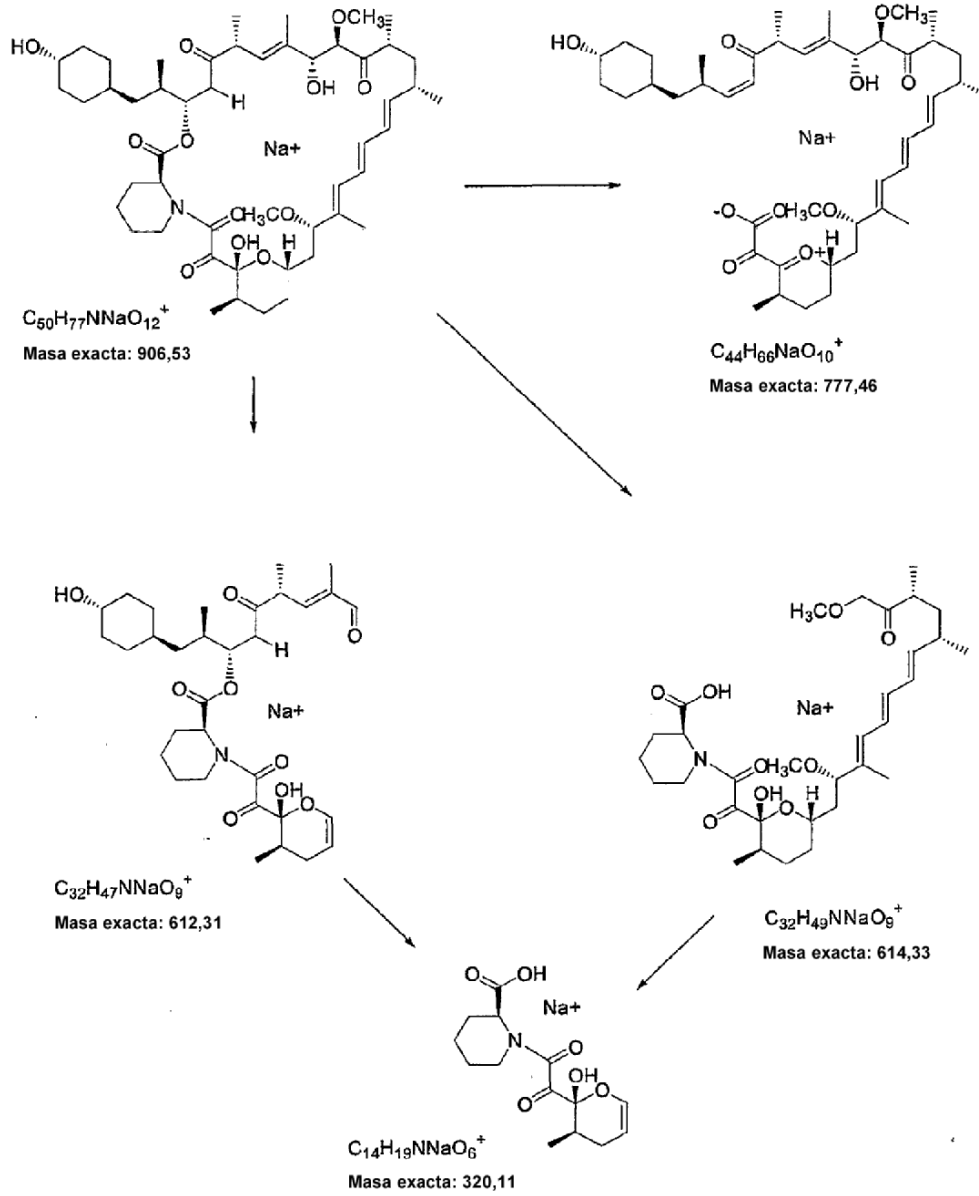


Figura 3

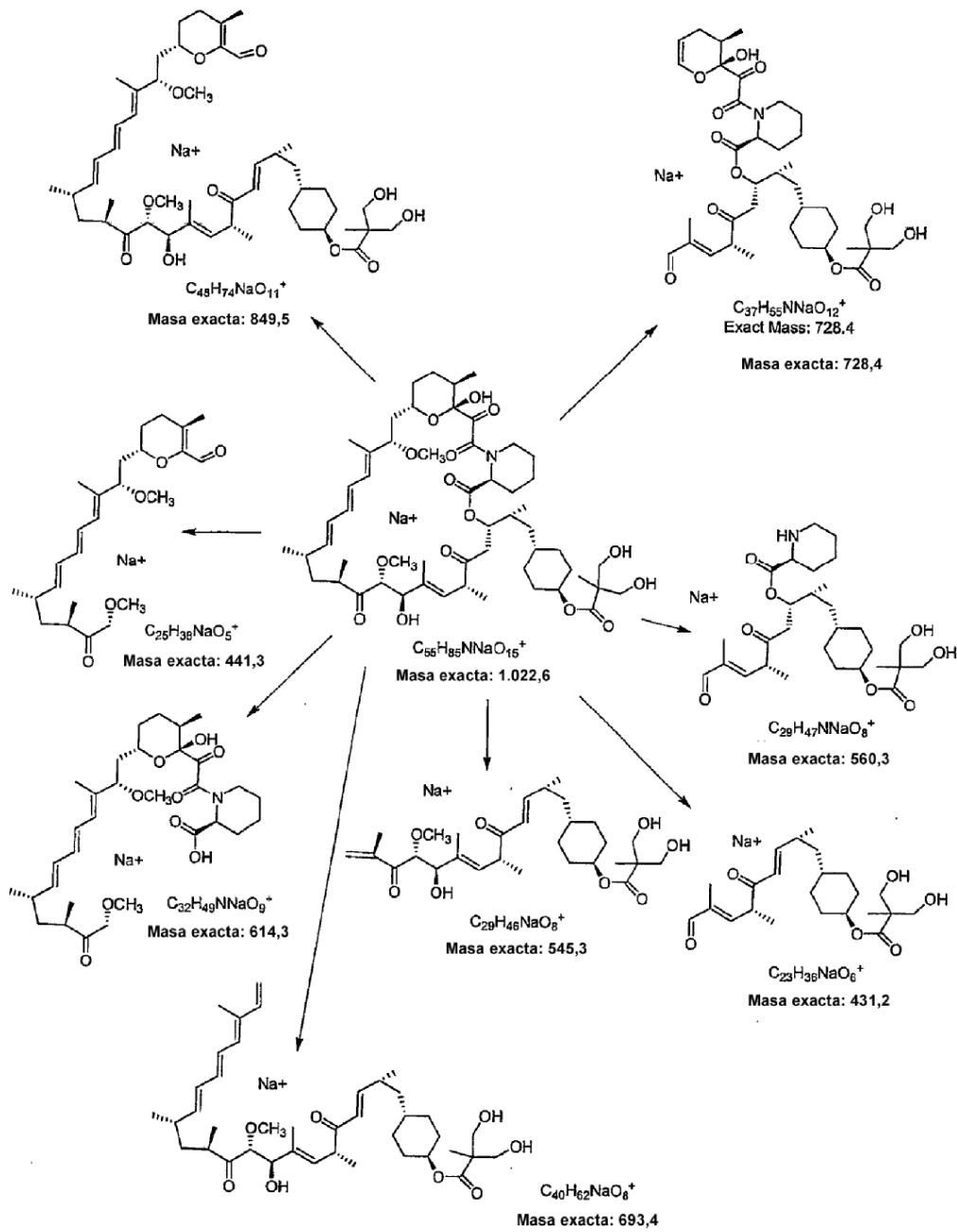


Figura 4

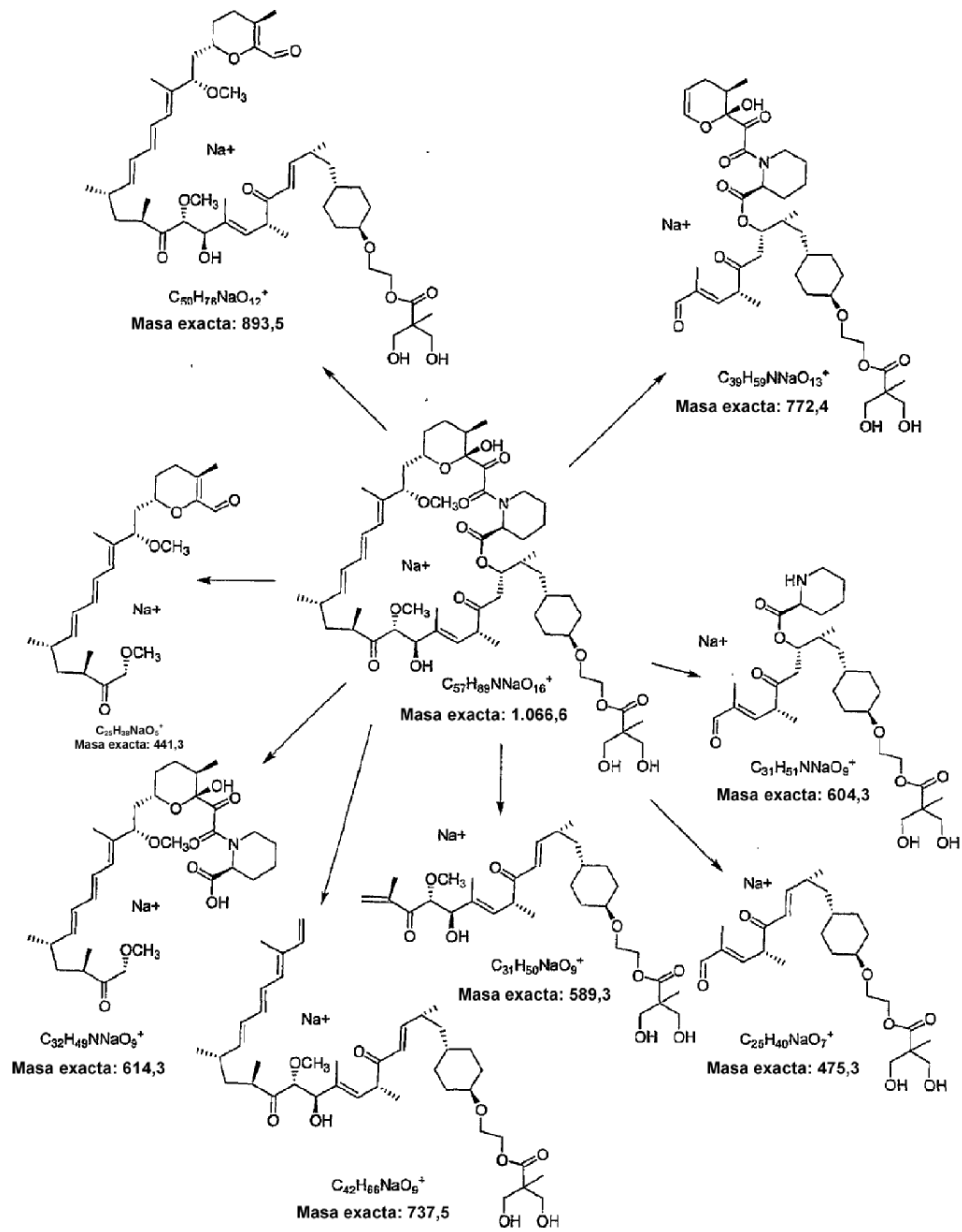


Figura 5

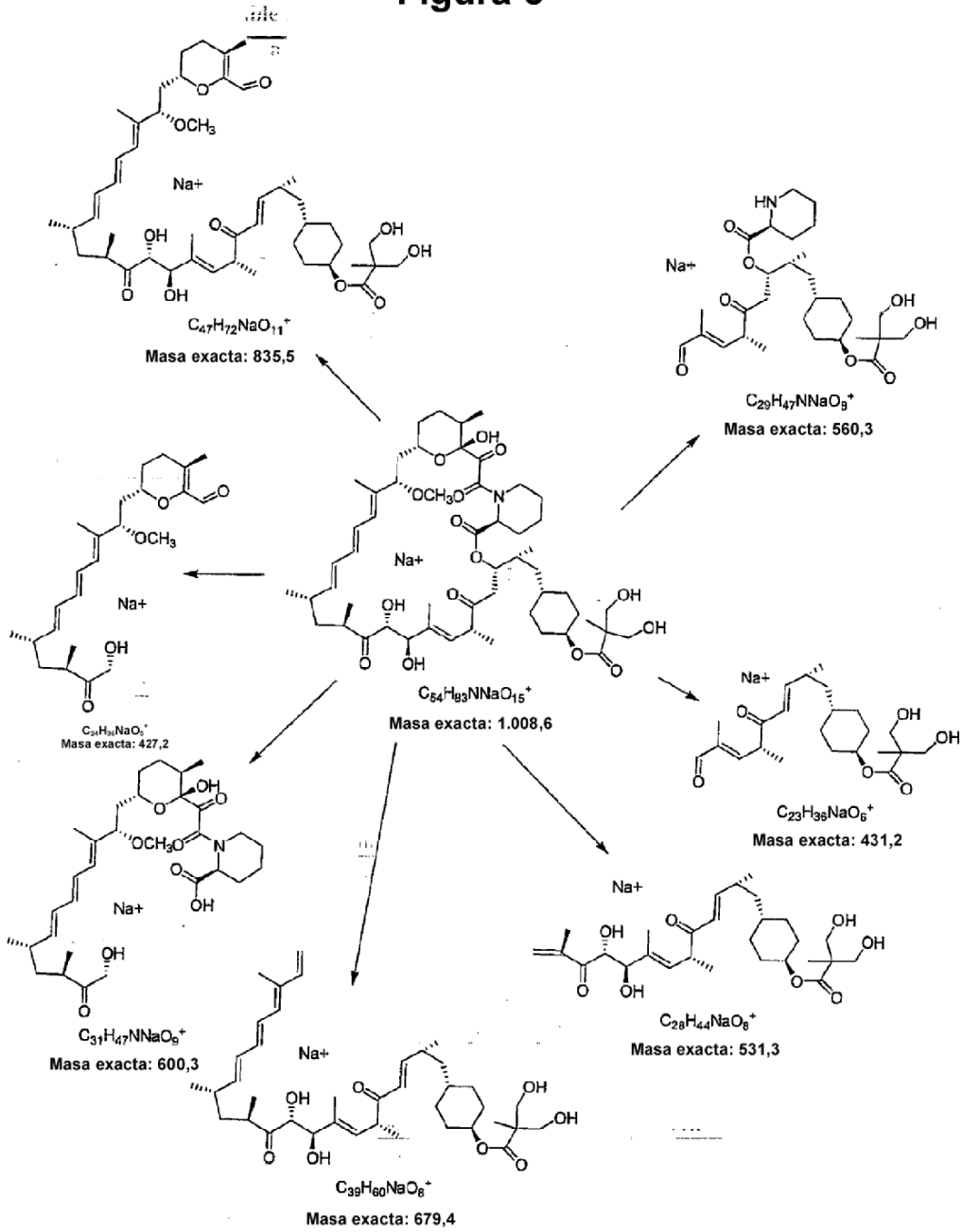
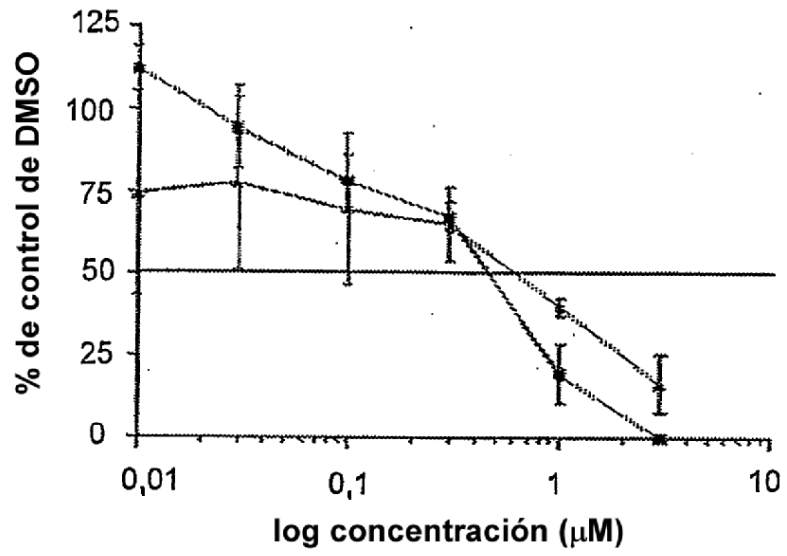


Figura 6

A



B

