

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 246**

51 Int. Cl.:

C07D 498/16 (2006.01)

C07D 498/18 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/GB2012/053228**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13093493**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12806101 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2797929**

54 Título: **Nuevo análogo de rapamicina**

30 Prioridad:

23.12.2011 GB 201122305

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GREGORY, MATTHEW ALAN;
MOSS, STEVEN JAMES y
WILKINSON, BARRIE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 664 246 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

Nuevo análogo de rapamicina

Resumen

5 La presente invención se refiere a un nuevo análogo de rapamicina y a procedimientos para su producción para su uso en terapia, especialmente para su uso en el tratamiento del lupus y/o la esclerosis múltiple (EM).

Antecedentes de la invención

10 El lupus es una enfermedad autoinmune multisistémica en la que muchos órganos, incluido el riñón, pueden verse afectados. Es una enfermedad inflamatoria crónica cuya fisiopatología se manifiesta por la producción de autoanticuerpos dirigidos contra múltiples autoantígenos, particularmente los de origen nuclear. Esta regulación alterada del sistema inmunológico da como resultado una pérdida de autotolerancia y está mediada por los linfocitos T y B. (Reddy y col., *Arthritis Research & Therapy*, 2008, 10:R127; y referencias citadas en las mismas). Hay muy pocos medicamentos aprobados para el tratamiento del lupus (Francis y Perl, 2009; Mok, 2010). Estos incluyen: la prednisona (tratamiento de los brotes y de mantenimiento), la hidroxicloroquina (lupus discoide y LES), la aspirina (artritis y pleuritis), el hexacetónido de triamcinolona (lupus discoide) y, más recientemente, Benlysta (LES). Además, regularmente se prescriben otros muchos agentes, incluidos la azatioprina (como agente ahorrador de corticosteroides) y, en regímenes más agresivos, corticosteroides en combinación con variaciones de ciclofosfamida, micofenolato mofetilo o los inhibidores de la calcineurina, tales como ciclosporina y tacrolimus (Mok, 2010). Para los pacientes que son intolerantes o resistentes a los agentes enumerados anteriormente, se han utilizado diversos agentes biológicos, incluyendo inmunoglobulina intravenosa y el agente depleción de linfocitos B rituximab, aunque se han planteado problemas de seguridad sobre este último por un posible vínculo con la infección de leucoencefalopatía multifocal progresiva.

15 Se están desarrollando varios agentes nuevos para el tratamiento del lupus. Estos incluyen estudios para encontrar formas más seguras de utilizar las terapias inmunosupresoras descritas anteriormente (azatioprina, ciclofosfamida, micofenolato mofetilo) y varias terapias con anticuerpos dirigidos a linfocitos B que exhiben efectos potentes pero acontecimientos adversos significativos (véanse revisiones en Mok, 2010; Francis y Perl, 2009).

20 Se ha demostrado que la actividad de mTOR (diana en mamíferos de la rapamicina) está regulada positivamente en los linfocitos T de pacientes con enfermedades autoinmunes, incluyendo lupus y esclerosis múltiple (EM) (Fernandez y col., 2009a,b), y que la inhibición de mTORC1 por la rapamicina y sus análogos inhibe la proliferación de los linfocitos T y B dirigida por la IL-2 inducida por antígeno. Además, la actividad de la rapamicina y sus análogos no bloquea la proliferación de todos los subtipos de linfocitos T y en realidad inducen la expansión selectiva de los linfocitos T reguladores (Treg) que son importantes para mantener la autotolerancia inmunitaria (Donia y col., 2009; Esposito y col., 2010).

25 La activación anormal de los linfocitos T en el LES está relacionada con la elevación sostenida del potencial transmembrana mitocondrial, que a su vez está controlado por una serie de aportes metabólicos y relacionados con el estrés (Perl y col., 2004; Fernandez y col., 2009; Fernandez y Perl, 2009). mTOR es un sensor de estos aportes y, como consecuencia, en los linfocitos T en el lupus se observa una señalización elevada de mTOR, un efecto que se normaliza mediante tratamiento con rapamicina (Perl y col., 2004; Fernandez y col., 2009). Además, en dos estudios independientes se ha identificado una red de genes con la regulación alterada en la enfermedad asociada al lupus/nefritis. Existe una fuerte correlación entre la transcripción anormal de estas redes de genes y la señalización de mTOR, y el tratamiento con rapamicina devuelve los niveles de transcripción de los genes a niveles asintomáticos. Reddy y col., 2008; Wu y col., 2007).

30 La rapamicina es eficaz cuando se administra por vía oral en modelos preclínicos de lupus en ratones. Por ejemplo, utilizando el modelo de nefritis lúpica en ratones New Zealand Black White NZBW/F1, la rapamicina mejoró significativamente la evolución clínica de la nefritis lúpica (Stylianou y col., 2010; Liu y col., 2008). En el estudio realizado por Liu y col., (2008), el tratamiento con rapamicina disminuyó significativamente la albuminuria, mejoró la supervivencia, disminuyó la esplenomegalia, conservó la función renal y redujo los niveles de anticuerpos anti-ADNdc en suero. Las secciones de riñón de ratones tratados con solución salina revelaron una marcada proliferación mesangial, dilatación tubular con depósito de cilindros proteicos intratubulares e infiltración leucocitaria del intersticio. Los ratones tratados con rapamicina, por el contrario, presentaba cambios histológicos relativamente leves en los riñones. El tratamiento con rapamicina también redujo significativamente la cantidad de depósito de complejo inmune en los glomérulos, suprimió la infiltración intersticial por linfocitos T, linfocitos B y macrófagos, además de regular por disminución la expresión intrarrenal de RANTES. Stylianou y col., (2010) observaron que, en ratones sin tratar, frente a los controles sanos, había sobreexpresión y fosforilación de Akt y mTOR en el residuo de activación clave y la rapamicina también prolongó la supervivencia, mantuvo la función renal normal, normalizó la proteinuria, restauró los niveles de nefrina y podocina, redujo los títulos anti-ADNdc, mejoró las lesiones histológicas y redujo la activación de la expresión glomerular de Akt y mTOR. También se han publicado otros ejemplos con éxito de uso de rapamicina en ratones NZBW/F1 (Alperovich y col., 2007; Liu y col., 2008b). También se ha demostrado que la rapamicina prolonga la supervivencia y reduce los cambios inflamatorios en varios órganos, incluyendo los

riñones, en el modelo de MRL/lpr de LES murino (Warner y col., 1994).

La rapamicina se ha estudiado en seres humanos como parte de un ensayo clínico de nueve pacientes con LES que habían sido tratados sin éxito con otros medicamentos inmunosupresores (Fernandez y col., 2006). La rapamicina fue bien tolerada y resultó eficaz para la reducción y el control de la actividad de la enfermedad en los 9 pacientes. Se ha informado sobre la actividad de la enfermedad mediante la puntuación de BILAG (British Isles Lupus Assessment Group) y el índice SLEDAI (índice de la actividad de enfermedad del LES) y la dosis simultánea de prednisona en el momento del inicio de la administración de rapamicina y la última visita de seguimiento (después de 6-48 meses de tratamiento). El índice de brotes de la enfermedad BILAG se redujo en 7 pacientes, no varió en 1 paciente y aumentó en 1 paciente. En este último paciente, el aumento en la puntuación BILAG (que se considera un instrumento altamente sensible para detectar brotes de enfermedad) se debió a artralgias transitorias durante el último período de observación, que no requirió el ajuste de la dosis de prednisona. En el último seguimiento, la reducción media \pm SEM en la puntuación BILAG en los 9 pacientes en comparación con el pretratamiento fue de $1,93 \pm 0,9$ (PAG = 0,0218). El SLEDAI se redujo en $5,3 \pm 0,8$ (intervalo 2-8) (PAG = 0,00002). Después del tratamiento con rapamicina, la reducción media \pm SEM de la dosis diaria de prednisona en los 7 pacientes a los que se les ha prescrito fue de $26,4 \pm 6,7$ mg (PAG = 0,0062). Tres de los pacientes tenían nefritis lúpica tratada con ciclofosfamida. En los 3, la nefritis permaneció en remisión a lo largo del período de tratamiento con rapamicina, con niveles normales de creatinina en suero y niveles de proteína en orina de <300 mg/24 horas.

Se midieron las características clínicas de 7 pacientes con LES de control no tratados con rapamicina. Las puntuaciones de la actividad de la enfermedad de estos pacientes fueron más altas que las de los pacientes que habían recibido 6-48 meses de tratamiento con rapamicina (puntuación BILAG media de 5,00 frente a 2,11 [PAG = 0,02]; puntuación SLEDAI media 3,14 frente a 1,55 [PAG = 0,11]). Estas observaciones son coherentes con la idea de que el tratamiento con rapamicina es beneficioso en el LES. Se usaron linfocitos T de 7 controles sanos, 7 controles con LES y 6 pacientes con LES tratados con rapamicina para estudios de señalización de Ca^{2+} y potencial transmembrana mitocondrial. Aunque persistió la hiperpolarización mitocondrial (HPM), los niveles basales de $[Ca^{2+}]_c$ y $[Ca^{2+}]_m$ y el flujo rápido de Ca^{2+} inducido por la activación de los linfocitos T se normalizaron en los pacientes tratados con rapamicina. Los linfocitos T de pacientes con LES que no estaban recibiendo rapamicina mostraron niveles significativamente elevados de Ca^{2+} en cada punto de tiempo, con valores P frente a los niveles en controles sanos que varían entre 0,0008 a tiempo 0 y 0,023 a los 16 minutos. Por el contrario, el nivel de flujo de Ca^{2+} inducido por CD3/CD28 en linfocitos T de los pacientes con LES tratados con rapamicina no fue significativamente diferente del de las células de donantes sanos.

En resumen, la rapamicina ha mostrado efectos positivos en el lupus murino y los hallazgos en un estudio clínico realizado en seres humanos de 9 pacientes tratados con rapamicina indicaron que la rapamicina puede controlar eficazmente la actividad de la enfermedad en el LES. La artritis mejoró en los 9 pacientes y la nefritis tratada con ciclofosfamida en 3 pacientes permaneció en remisión durante el tratamiento con rapamicina. La administración oral diaria única y el tamaño pequeño de la píldora fueron del agrado y bien tolerados por todos los pacientes. Ninguno de los pacientes suspendió el medicamento debido a la falta de eficacia o a efectos adversos.

Los pacientes con lupus tienen un alto riesgo de aterosclerosis (Gorman e Isenberg, 2004). De hecho, varias estimaciones sugieren que hasta el 30 % de las muertes en pacientes con lupus puede deberse a una enfermedad de las arterias coronarias (Aranow y Ginzler, 2000; Petri y col., (1992); Gorman e Isenberg, 2004). Se sabe que la rapamicina y otros análogos de la rapamicina usados clínicamente causan una elevación en los niveles circulantes de lípidos/triglicéridos y en los niveles de colesterol en pacientes humanos (Morisset y col., 2002). Dado el bien establecido vínculo entre los niveles en sangre elevados de lípidos/triglicéridos y de colesterol y la aterosclerosis/enfermedad cardiovascular, los análogos de rapamicina con una eficacia similar a la rapamicina como inhibidor de mTOR, pero con un efecto significativamente menor sobre la elevación de los niveles de lípidos/triglicéridos y colesterol serían extremadamente útiles para el tratamiento del lupus y otras enfermedades en las que la inhibición de mTOR puede ser eficaz. El abanico de enfermedades en las que la rapamicina, o análogos mejorados, pueden ser eficaces como agentes farmacológicos, incluye, aunque no de forma limitativa, lupus, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer. Se ha publicado una revisión reciente de las indicaciones neurológicas para las que la rapamicina o los análogos de rapamicina pueden ser tratamientos eficaces (Bove y col., 2011).

La esclerosis múltiple (EM) es un trastorno autoinmune crónico del sistema nervioso central (SNC) que se caracteriza por una inflamación que da lugar a astrogliosis, desmielinización y pérdida de oligodendrocitos y neuronas (Brinkmann y col., 2010; Compston y Coles, 2002). La EM es la causa principal de discapacidad neurológica en adultos jóvenes y de mediana edad, que afecta a aproximadamente 2,5 millones de personas en todo el mundo (Federación Internacional de Esclerosis Múltiple. Atlas of MS Database. *sitio web de la Federación Internacional de la Esclerosis Múltiple* [online], <http://.atlasofms.org/index.aspx> (2008)). La prevalencia es mayor en los caucásicos, con tasas elevadas de prevalencia notificadas en Europa, Canadá, EE. UU., Australia, Nueva Zelanda y el norte de Asia (Rosati, 2001; Noseworthy y col., 2000). La mayoría de los pacientes son diagnosticados entre las edades de 20 y 40 años (en una relación de 2:1 de mujer a varón) (Compston y Coles, 2002). En el momento del diagnóstico, aproximadamente el 85 % de los pacientes tienen EM recidivante-remite (EMRR), que se caracteriza por exacerbaciones agudas recurrentes (recaídas) de disfunción neurológica, seguidas de recuperación. Una proporción sustancial (42-57 %) de recaídas puede dar como resultado una recuperación

incompleta de la función y conducir a incapacidad y deterioro permanente (Lublin y col., 2003). En un plazo de 6-10 años desde el inicio de la enfermedad, el 30-40 % de los pacientes con EMRR han progresado a EM progresiva secundaria (Weinshenker y col., 1989), en la que parece predominar un curso de enfermedad menos inflamatorio y más neurodegenerativo. La EM progresiva secundaria se presenta con progresión constante de la incapacidad, con o sin recaídas superpuestas.

Las estrategias de tratamiento para la EM normalmente involucran el tratamiento de los síntomas y el uso de medicamentos modificadores de la enfermedad para reducir la frecuencia de recaídas y disminuir la progresión de la incapacidad. Las terapias de primera línea establecidas: productos de interferón- β (IFN- β) y acetato de glatiramer (Copaxone; Teva): proporcionan una reducción del ~30-35 % en la tasa de recaídas en comparación con el placebo durante 2 años (Grupo de estudio PRISMS, 1998; El Grupo de estudio de esclerosis múltiple IFNB, 1993; Jacobs y col., 1996; Johnson y col., 1995). También se ha demostrado que el IFN- β 1a reduce la progresión de la incapacidad en pacientes con EMRR (Goodin y col., 2002). Estos agentes se administran mediante inyecciones (con programas de dosificación que van desde inyecciones subcutáneas diarias hasta inyecciones intramusculares semanales) y pueden afectar al sistema inmunitario en varios niveles. Los efectos secundarios más frecuentes incluyen síntomas similares a la gripe y reacciones en el lugar de la inyección, que pueden afectar a la tolerabilidad y el cumplimiento (Patti, 2010). Los acontecimientos adversos notificados con menos frecuencia para las terapias con IFN- β incluyen disfunción hepática y citopenias (Ricey col., 2001).

Una terapia aprobada más recientemente, natalizumab (Tysabri; Elan/Biogen-Idec), es un anticuerpo monoclonal humanizado específico de la subunidad α 4 de la integrina α 4 β 1 (también conocido como antígeno 4 muy tardío) en los linfocitos (Steinman, 2005; Putzki y col., 2010). Se administra a través de infusiones intravenosas cada 4 semanas y parece ofrecer una mayor eficacia en comparación con otros productos aprobados (Putzki y col., 2010). Sin embargo, el natalizumab se ha asociado con reacciones de hipersensibilidad y con leucoencefalopatía multifocal progresiva, una enfermedad desmielinizante infecciosa del cerebro rara pero gravemente incapacitante o mortal (Steinman, 2005). Otro producto, el agente citostático mitoxantrona (para el cual no se ha identificado el objetivo celular), está aprobado para su uso en formas graves de EM recidivante. Sin embargo, la toxicidad cardíaca acumulada relacionada con la dosis y el riesgo de leucemia secundaria limitan la cantidad total que se puede administrar (Kingwell, y col., 2010). Debido a sus perfiles de seguridad, e natalizumab y la mitoxantrona se usan actualmente solo como tratamientos de segunda y tercera línea. Los fármacos en desarrollo para la EM incluyen los anticuerpos monoclonales rituximab, ocrelizumab y ofatumumab, que están dirigidos a CD20 para reducir los linfocitos B, así como alemtuzumab (Campath-1H), que está dirigido a CD52 para eliminar los linfocitos T y B y algunas células dendríticas derivadas de monocitos (Buttmann, 2010). También se están desarrollando moléculas pequeñas, incluidos los agentes orales cladribina (un nucleósido de purina resistente a la adenosina desaminasa citotóxica), fumarato (un activador de la vía del factor de transcripción 2 relacionado con el factor nuclear E2), laquinimod (el objetivo celular del cual no se ha identificado) y teriflunomida (un inhibidor citostático de la dihidroorotato deshidrogenasa, que cataliza la etapa limitante de la velocidad en la síntesis *de novo* de pirimidinas). Todos estos agentes están dirigidos a los linfocitos, así como a otras células, con el objetivo de inhibir el ataque mediado por el sistema inmunológico en el SNC (Niino y Sasaki, 2010). El modulador del receptor de esfingosina 1-fosfato (S1 P) fingolimod (FTY720/Gilenya; Novartis) fue el primer tratamiento oral para la EMRR aprobado por la FDA de EE. UU. (Brinkmann y col., 2010). Aunque los ensayos hasta ahora han demostrado que el fingolimod es bien tolerado, los efectos secundarios que se han producido incluyen dolor de cabeza, infecciones del tracto respiratorio superior, dificultad para respirar, diarrea y náuseas. Además, se han observado niveles incrementados de enzimas hepáticas y presión arterial, aunque estos son generalmente leves. En el ensayo clínico TRANSFORMS (Prueba de evaluación inyectable Interferonvs. FTY720 Oral e la EMRR; ClinicalTrials.gov número, NCT00340834), se produjeron dos muertes como resultado de las infecciones por el virus del herpes en pacientes que tomaban la dosis más alta de fingolimod (véase Garber, 2008). Otros aspectos de los tratamientos que estos dos pacientes recibieron pueden haber contribuido, pero no se puede excluir un papel para el fingolimod debido a su acción inmunomoduladora, que podría conducir a un mayor riesgo de infecciones.

Dadas las limitaciones de las terapias actualmente disponibles, el desarrollo de tratamientos orales para la EM que podrían ofrecer un tratamiento más efectivo y más conveniente ha sido el foco de esfuerzos considerables para el descubrimiento y desarrollo de fármacos en los últimos años.

La eficacia de la rapamicina y sus análogos en la EM es probablemente atribuible a una combinación de su actividad neuroprotectora debido a la inhibición de inunofilina/neurofilina y la actividad antiinflamatoria/inmunosupresora impulsada por la inhibición selectiva de mTORC1 y las propiedades remielinizantes que pueden estar dirigidas por ambos mecanismos. La rapamicina y sus análogos son moléculas inmunosupresoras, y antiinflamatorias que modulan la proliferación de los linfocitos T a través de su capacidad para inhibir el complejo 1 de mTOR (mTORC1) después de unir primero la inunofilina FKBP12. La actividad de mTOR está regulada por aumento en individuos que padecen trastornos autoinmunes, incluidos EM y lupus (Fernandez y col., 2009a,b), y la inhibición de mTORC1 por la rapamicina y sus análogos inhibe la proliferación de los linfocitos T (y B) dirigida por la IL-2 inducida por antígeno. La rapamicina y sus análogos no bloquean la proliferación de todos los subtipos de linfocitos T y en realidad inducen la expansión selectiva de los linfocitos T reguladores (Treg) que son importantes para mantener la autotolerancia inmunitaria (Donia y col., 2009; Esposito y col., 2010).

La rapamicina y sus análogos se unen estrechamente a la familia de inunofilinas de la proteína de unión a FK506

(FKBP) (Cao y Konsolaki, 2011; Gerard y col., 2011). La familia FKBP consiste en proteínas con diversos dominios de interacción proteína-proteína y funciones celulares versátiles (Kang y col., 2008). Todos los FKBP contienen un dominio con actividad prolifera cis/trans isomerasa (PPLasa). La unión de rapamicina o análogos a este dominio inhibe su actividad PPLasa al tiempo que media en la supresión inmune a través de la inhibición de mTOR. Los miembros más grandes, FKBP51 y FKBP52, interactúan con Hsp90 y exhiben actividad de chaperona que se ha demostrado que regula la señalización de la hormona esteroide. A partir de estos estudios, es evidente que las proteínas FKBP se expresan de manera ubicua, pero muestran niveles relativamente altos de expresión en el sistema nervioso. De acuerdo con esta expresión, las FKBP se han implicado tanto con la neuroprotección como con la neurodegeneración (Cao y Konsolaki, 2011; Gerard y col., 2011; Bove y col., 2011; Kang y col., 2008). La rapamicina es un inhibidor nM de la actividad PPLasa de varias neurofilinas, incluidas FKBP12 y FKBP52, y se ha demostrado que la unión a estas proteínas contribuye a sus efectos neuroprotectores (Ruan y col., 2008). FKBP52 se une a Tau y la sobreexpresión de la proteína Tau está relacionada con la inhibición del sobrecrecimiento de las neuritas y la neuroprotección (Chambraud y col., 2010). FKBP52 controla la dirección quimiotrófica de los conos de crecimiento neuronal mediante la regulación de la apertura del canal TRPC1 (Shim y col., 2009). Estos datos proporcionan un enlace para la promoción del sobrecrecimiento de neuritas, la regeneración axonal y los efectos neuroprotectores observados para la inactivación/inhibición de FKBP52. FKBP12 se ha propuesto muchas veces como el principal mediador de los efectos neuroprotectores de las inmunofilinas, por ejemplo, la protección de FK506 contra el daño inducido por la privación de oxígeno-glucosa no estaba presente cuando se añadió un anticuerpo anti-FKBP12 (Labrande y col., 2006), la expresión de FKBP12 aumenta en el cerebro de pacientes con enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y algunas formas de demencia (Avramut y col., 2002). También se ha implicado como el potenciador más potente de la agregación de α -sinucleína (Gerard y col., 2010; Deleersnijder y col., 2011).

Se ha demostrado que la rapamicina es eficaz en modelos experimentales preclínicos de EM. Por ejemplo, se ha informado sobre el efecto de la administración de rapamicina en ratones SJL/j afectados por encefalomiелitis autoinmune experimental recidivante remitente inducida por PLP139-151 (EAE RR) (Esposito y col., 2010). El tratamiento oral o intraperitoneal en el pico de la enfermedad o al final del primer ataque clínico, mejoró drásticamente el curso clínico de la EAE -RR. La suspensión del tratamiento dio como resultado la reaparición temprana de la enfermedad. La respuesta clínica se asoció con desmielinización reducida del sistema nervioso central y pérdida axonal. La doble acción de la rapamicina en los linfocitos Teff y Treg dio como resultado una modulación de su relación que se asemejaba estrechamente al curso de la enfermedad. Los datos mostraron que la rapamicina inhibe la EAE-RR, proporcionaron evidencia de los mecanismos inmunológicos e indicaron que este compuesto es un candidato potencial para el tratamiento de la esclerosis múltiple. En un segundo ejemplo (Donia y col., 2009), se evaluaron los efectos de la rapamicina en el curso de la encefalomiелitis alérgica experimental recidivante prolongada (EAE-RP) en ratas Dark Agouti (DA), que sirve como modelo preclínico de la EM. Los datos mostraron que la administración oral de rapamicina a 3 mg/kg durante 28 días consecutivos mejoró significativamente el curso de la EAE-RP en ratas DA. Las ratas que recibieron la medicación tuvieron puntuaciones acumuladas clínicas significativamente más bajas y una duración más corta de la enfermedad que las ratas de control tratadas con el vehículo.

La utilidad clínica en la EM de la rapamicina se ha demostrado directamente, pero su análogo cercano e inhibidor de mTOR temsirolimus se ha estudiado hasta la Fase 2B, donde se evaluó la eficacia y seguridad de temsirolimus en pacientes con EM remitente recidivante clínicamente definida (EMRR) o EM progresiva secundaria con recaídas (Kappos y col., 2005; Moraal y col., 2010). Fue un ensayo clínico multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, de fase 2 realizado en 296 pacientes de 19-57 años de edad. Los pacientes recibieron temsirolimus oral (2, 4 u 8 mg) 1x al día o placebo durante 9 meses. El criterio de evaluación principal fue el número acumulado de nuevas lesiones T1 potenciadas con Gd a los 9 meses en la RMN. El volumen total del cerebro, el número de recaídas, las puntuaciones medias de EDSS, otras medidas de RMN y los resultados de salud fueron los criterios de evaluación secundarios.

Los pacientes que recibieron 8 mg de temsirolimus lograron reducciones significativas (47,8 %) en el número acumulado de nuevas lesiones T1 potenciadas en Gd en la RM en comparación con el placebo ($p = 0,010$). Los criterios de evaluación en la RM mostraron una respuesta a la dosis, la dosis de 8 mg alcanzó significación estadística para el criterio de evaluación principal a las 32 semanas ($p = 0,024$). Los datos del volumen cerebral sugirieron una disminución en la atrofia del volumen cerebral a las 36 semanas en el grupo de 8 mg en comparación con el placebo. El grupo de 8 mg mostró una reducción del 51 % en el número de recaídas por paciente frente al placebo ($p = 0,023$). También se observaron tendencias relacionadas con la dosis en el porcentaje de pacientes sin recaída y la progresión de la discapacidad. Se produjeron acontecimientos adversos graves a frecuencias similares en todos los grupos de tratamiento. La estomatitis aftosa/ulceración bucal, la hiperlipidemia, las erupciones cutáneas y la disfunción menstrual se notificaron con mayor frecuencia en el grupo de 8 mg frente al placebo. Se concluyó que una dosis oral de 8 mg de temsirolimus administrada durante 9 meses en pacientes con formas recidivantes de esclerosis múltiple dio lugar a efectos beneficiosos significativos sobre la incidencia de nuevas lesiones potenciadas en la RM y el número de recaídas, con un perfil aceptable de riesgo/beneficio.

La rapamicina (sirolimus) (Figura 4) es un macrólido lipofílico producido por *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 (Sehgal y col., 1975; Vézina y col., 1975; el documento U.S. 3.929.992; el documento U.S. 3.993.749) con un resto 1,2,3-tricarbonilo unido a una lactona de ácido piperólico (Paiva y col., 1991). Para el fin de la presente invención, la rapamicina se describe mediante la convención de numeración de McAlpine. y col., (1991) en preferencia a las

convenciones de numeración de Findlay y col., (1980) o Chemical Abstracts (11º Índice acumulativo, 1982-1986 (p60719CS).

La rapamicina tiene un importante valor terapéutico debido a su amplio espectro de actividades biológicas (Huang y col., 2003). El compuesto es un potente inhibidor del objetivo mamífero de la rapamicina (mTOR), una serina-treonina quinasa cadena abajo de la ruta de señalización de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt (proteína quinasa B) que media en la supervivencia y la proliferación celular. Esta actividad inhibidora se obtiene después de que la rapamicina se une a la proteína de unión a inmunofilina FK506 12 (FKBP12) (Dumont, F.J. y Q. X. Su, 1995). En los linfocitos T, la rapamicina inhibe la señalización del receptor de IL-2 y la posterior autoproliferación de los linfocitos T, dando como resultado inmunosupresión. La rapamicina se comercializa como un inmunosupresor para el tratamiento de pacientes con trasplante de órganos para prevenir el rechazo del injerto (Huang y col., 2003). Además de la inmunosupresión, la rapamicina ha encontrado aplicación terapéutica en el cáncer (Vignot y col., 2005) y tiene un potencial uso terapéutico en el tratamiento de varias enfermedades, por ejemplo, cáncer, enfermedades cardiovasculares, tales como reestenosis, enfermedades autoinmunes, tales como esclerosis múltiple y lupus, artritis reumatoide, infección fúngica y enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington.

A pesar de su utilidad en diversos estados de enfermedad, la rapamicina tiene una serie de inconvenientes importantes. El acontecimiento adverso más grave asociado con su uso es la hiperlipidemia. Esto puede conducir a la reducción de la dosis y a la retirada del tratamiento. En particular, cualquier potencial que esta clase tiene en el LES es limitado debido a los niveles de lípidos naturalmente altos en estos pacientes (Aranow y Ginzler, 2000; Petri y col., (1992); Gorman e Isenberg, 2004). También es un sustrato de la glicoproteína P de la bomba de eflujo de la membrana celular (P-gp; LaPlante y col., 2002, Crowe y col., 1999), que bombea el compuesto hacia fuera de la célula, haciendo que la penetración de las membranas celulares por la rapamicina sea mala. Esto causa una mala absorción del compuesto después de la dosificación. Además, dado que un mecanismo principal de resistencia a múltiples fármacos de las células cancerosas es a través de la bomba de eflujo de la membrana celular, la rapamicina es menos eficaz contra las células de cáncer de resistencia a múltiples fármacos (MDR). La rapamicina también se metaboliza ampliamente por las enzimas del citocromo P450 (Lampen y col., 1998). Su pérdida en el primer pase hepático es alta, lo que contribuye adicionalmente a su baja biodisponibilidad oral. El papel de CYP3A4 y P-gp en la baja biodisponibilidad de la rapamicina se ha confirmado en estudios que demuestran que la administración de inhibidores de CYP3A4 y/o P-gp disminuyó la salida de la rapamicina de células Caco-2 transfectadas con CYP3A4 (Cummins y col., 2004) y que la administración de inhibidores de CYP3A4 disminuyó el metabolismo del intestino delgado de la rapamicina (Lampen y col., 1998). La baja biodisponibilidad oral de la rapamicina causa una variabilidad interindividual significativa que da como resultado un resultado terapéutico inconsistente y una dificultad en el tratamiento clínico (Kuhn y col., 2001, Crowe y col., 1999).

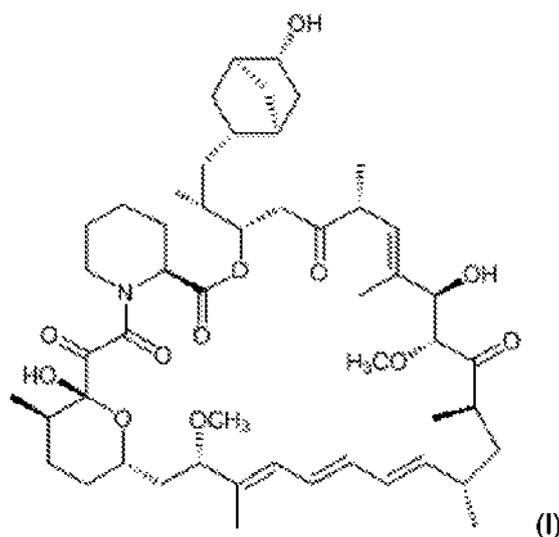
Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos compuestos similares a la rapamicina que tengan efectos secundarios reducidos, incluida la hiperlipidemia, no sean sustratos de la P-gp y que puedan ser metabólicamente más estables y, por lo tanto, puedan tener una biodisponibilidad mejorada.

Se ha informado una gama de análogos de rapamicina sintetizados que usan los sitios disponibles químicamente de la molécula. La descripción de los siguientes compuestos se adaptó al sistema de numeración de la molécula de rapamicina descrita en la Figura 4. Los sitios disponibles químicamente en la molécula para derivatización o reemplazo incluyen grupos hidroxilo C40 y C28 (por ejemplo, el documento U.S. 5,665,772; el documento U.S. 5,362,718), grupos metoxi C39 y C16 (por ejemplo, documento WO 96/41807; el documento U.S. 5,728,710), grupos cetó C32, C26 y C9 (por ejemplo, documento U.S. 5,378,836; documento U.S. 5.138.051; documento US 5.665.772). La hidrogenación en C17, C19 y/o C21, dirigida al trieno, dio como resultado la retención de la actividad antifúngica pero la pérdida relativa de inmunosupresión (por ejemplo, documento U.S. 5,391,730; documento US 5.023.262). Se han conseguido mejoras significativas en la estabilidad de la molécula (por ejemplo, la formación de oximas en C32, C40 y/o C28, documento U.S. 5,563,145, documento U.S. 5,446,048), la resistencia a ataques metabólicos (por ejemplo, U.S. 5,912,253), la biodisponibilidad (por ejemplo, documento U.S. 5,221,670; documento U.S. 5.955.457; documento WO 98/04279) y la producción de profármacos (por ejemplo, U.S. 6,015,815; documento U.S. 5,432,183) a través de derivatización.

Un objeto de la invención es identificar un derivado adicional de rapamicina que conserve sus efectos beneficiosos en la terapia sin algunos o ninguno de sus efectos secundarios. Además, es ventajoso tener una molécula que tenga una inhibición más potente de FKBP12.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un nuevo análogo de rapamicina, definido por la fórmula (I) a continuación,



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El compuesto de fórmula (I) (y cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo) se denomina en lo sucesivo "compuesto de la invención" o por su nombre genérico "37R-hidroxiornilrapamicina".

5 Definiciones

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o 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.

10 Como se usa en el presente documento, el término "lupus" incluye, sin limitación: lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, lupus eritematoso cutáneo agudo, lupus eritematoso cutáneo subagudo, lupus eritematoso cutáneo crónico, lupus eritematoso inducido por fármacos, lupus eritematoso del neonato,

Como se usa en el presente documento, los términos "esclerosis múltiple" o "EM" incluyen, sin limitación: esclerosis múltiple remitente recurrente, progresiva secundaria y progresiva primaria.

15 Como se usa en el presente documento, el término "**biodisponibilidad**" se refiere al grado o velocidad con la que un fármaco u otra sustancia se absorbe o está disponible en el sitio de la actividad biológica después de la administración. Esta propiedad depende de una serie de factores que incluyen la solubilidad del compuesto, la velocidad de absorción en el intestino, el grado de unión a proteínas y el metabolismo, etc. Se describen diversos ensayos de biodisponibilidad que resultarían familiares para una persona experta en la materia (véase, Trepanier y col., 1998, Gallant-Haidner y col., 2000).

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "en forma sustancialmente pura" significa que el compuesto se proporciona en una forma que está sustancialmente libre de otros compuestos (particularmente policétidos u otros análogos de rapamicina) producidos en procedimientos de fermentación, especialmente un procedimiento de fermentación que implica la alimentación del ácido de partida de fórmula (II) (véase más adelante) a una cepa productora de rapamicina que ha sido genéticamente alterada para eliminar o inactivar el gen *rapK* o un homólogo del mismo. Por ejemplo, la pureza del compuesto es al menos del 90 %, por ejemplo al menos del 95 %, por ejemplo al menos del 98 %, especialmente al menos del 99 % con respecto al contenido de policétido de la forma en que se presenta. Por tanto, tanto antes como después de la formulación como producto farmacéutico, el compuesto de la invención representa, adecuadamente, al menos el 90 %, por ejemplo al menos del 95 %, por ejemplo al menos el 98 %, por ejemplo, al menos el 99 % del contenido de policétido.

30 Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de la invención 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. Ejemplos más específicos de sales de ácidos adecuadas incluyen las de los ácidos bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, perclórico, fumárico, acético, propiónico, succínico, glicólico, fórmico, láctico, maleico, tartárico, cítrico, palmoico, malónico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, naftalen-2-sulfónico, bencenosulfónico hidroxinaftoico, yodhídrico, málico, esteroico, tánico y similares. Otros ácidos tales como el ácido oxálico, aunque en sí mismos no son farmacéuticamente aceptables, pueden ser útiles en la preparación de sales útiles como intermedios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables. Ejemplos más específicos de sales básicas adecuadas incluyen sales de sodio, litio, potasio, magnesio, aluminio, calcio, cinc, N,N'-dibenciletildiamina, clorprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, N-metilglucamina y sales de procaína.

La invención abarca solvatos de 37R-hidroxiorbornilrapamicina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. Los ejemplos de solvatos incluyen hidratos.

Las referencias expuestas más adelante en el presente documento a un compuesto de acuerdo con la invención incluyen tanto la 37R-hidroxiorbornilrapamicina como sus sales farmacéuticamente aceptables (y cualquier solvato de la misma).

Descripción de la invención

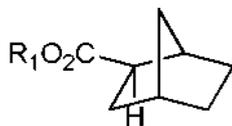
El compuesto de la invención, a pesar de su relación estructural con la rapamicina, muestra un perfil farmacológico sorprendentemente diferente. En particular, en comparación con la rapamicina o ciertos análogos conocidos, muestra una semivida más corta y niveles de lípidos significativamente reducidos después de la dosificación repetida, y se espera que muestre mayor biodisponibilidad, mayor permeabilidad de la membrana celular y disminución del eflujo en comparación con la rapamicina, y puede ser menor de un sustrato para P-gp.

Por lo tanto, las propiedades ventajosas del compuesto de la invención incluyen:

- buena inhibición de mTOR (medida por inhibición de la fosforilación de la S6 quinasa) con una potencia que es similar o mayor que la de la rapamicina y otros análogos (véase el Ejemplo 3);
- semivida menor en comparación con la rapamicina (basada en estudios en ratas, véase el Ejemplo 4); e
- incidencia reducida de la hiperlipidemia después de una dosificación oral repetida a niveles requeridos para una eficacia similar a la del análogo de rapamicina CCI-779 (basado en estudios en ratones, véase el Ejemplo 5).
- una inhibición más potente de FKBP12 que la rapamicina, lo que conduce a un aumento del efecto neuroprotector

En el tratamiento de enfermedades tales como el lupus y la EM se espera que la corta semivida conduzca a un índice terapéutico mejorado porque se espera que los efectos secundarios que resultan de una exposición más prolongada (tal como, hiperlipidemia) se reduzcan significativamente.

El compuesto de la invención se puede producir como un producto directo de la fermentación, alimentando un ácido iniciador de fórmula (II)



en la que R₁ representa H o un grupo alquilo, tal como un grupo alquilo C1-6, por ejemplo metilo o etilo a una cepa productora de rapamicina que se ha alterado genéticamente para eliminar o inactivar el gen *rapK* o un homólogo del mismo.

Por "homólogo" en este contexto se entiende un gen cuyo producto es una corismatasa con función equivalente a la del producto del gen *rapK* RapK (Andexer y col., 2011).

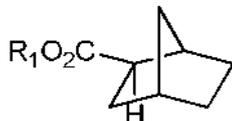
Las condiciones adecuadas para tal procedimiento se describen en los documentos WO04/007709 y WO06/016167. Específicamente, se generó una cepa mutante del organismo productor de rapamicina, *Streptomyces hygroscopicus*, que carece del gen *rapK* y se denomina *S. hygroscopicus ΔrapK* (BIOT-4010; véase el Ejemplo 1). Otras cepas de producción adecuadas incluyen *S. hygroscopicus* MG2-10 (pLL178), un derivado de *S. hygroscopicus* NRRL5491. La generación de *S. hygroscopicus* MG2-10 se describe en el ejemplo 2 del documento WO04/007709 y, para generar una cepa de producción adecuada, esto debe complementarse con *rapI₁JMNOQL*, usando un plásmido de expresión tal como pLL178 (como se describe en el ejemplo 7 del documento WO06/016167). La fermentación de BIOT-4010, o una cepa similar, como *S. hygroscopicus* MG2-10 (pLL178) (documentos WO04/007709, WO06/016167) en un medio adecuado, tal como, pero sin limitarse a, MD6, a una temperatura adecuada, tal como a 26 °C, con adición de alimentación exógena, por ejemplo, ácido (1R *, 2R *, 4S *) - biciclo[2.2.1] heptano-2-carboxílico, típicamente a las 24 horas es suficiente para la producción del compuesto de la invención, 37R-hidroxiorbornil-rapamicina (véase el Ejemplo 2). Los títulos máximos se observan entre 3 y 8 días desde la inoculación. La forma ácida del compuesto de fórmula (II) es ácido (1R, 2R, 4S)-biciclo[2.2.1] heptano-2-carboxílico.

Las cepas productoras de rapamicina incluyen *Streptomyces hygroscopicus*, *Actinoplastes sp.* N902-109 (véase Nishida y col., (1995)) y *Streptomyces sp.* A 91-261402 (véase el documento WO94/18207). Otras cepas productoras de rapamicina se mencionan en el documento WO95/06649.

La presente invención también proporciona el compuesto de la invención en forma sustancialmente pura. El compuesto de la invención se puede purificar, por ejemplo, a partir de otros componentes de fermentación (incluyendo otros componentes de policétido) por técnicas de separación convencionales, tales como cromatografía ultrarrápida, HPLC preparativa y/o cristalización.

De este modo, un procedimiento para preparar un compuesto de la invención en forma sustancialmente pura

comprende las etapas de (i) alimentar un ácido iniciador de fórmula (II)



5 en la que R₁ representa H o un grupo alquilo, a una cepa productora de rapamicina que ha sido genéticamente alterada para eliminar o inactivar el gen *rapK* o un homólogo del mismo; y (ii) aislar y purificar el compuesto de la invención.

La presente invención proporciona el compuesto de la invención para su uso como un producto farmacéutico, en particular en el tratamiento del lupus y/o la esclerosis múltiple (EM). En una realización específica, la presente invención proporciona el uso del compuesto de la invención en el tratamiento del lupus).

10 La presente divulgación también proporciona un procedimiento de tratamiento del lupus y/o la esclerosis múltiple (EM) que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz del compuesto de la invención.

La presente invención también proporciona el uso del compuesto de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del lupus y/o la esclerosis múltiple (EM).

15 El compuesto de la invención también puede ser útil en la inducción o mantenimiento de la inmunosupresión, la estimulación de la regeneración neuronal o el tratamiento de infecciones fúngicas, el rechazo de trasplantes, la enfermedad de injerto contra huésped, trastornos autoinmunitarios, enfermedades de la inflamación vascular o enfermedades fibróticas.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención junto con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

20 Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula (I) como se ha definido anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables en los que el compuesto de fórmula (I) está presente en el composición en una cantidad de al menos 95 %, por ejemplo al menos 98 %, especialmente al menos 99 % del contenido de polímero de la composición.

25 El compuesto de la invención o una formulación del mismo se puede administrar mediante cualquier procedimiento convencional, por ejemplo, pero sin limitación, se puede administrar por vía parenteral, oral, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), a través de un dispositivo médico (por ejemplo, una endoprótesis vascular), mediante inhalación o mediante inyección (subcutánea o intramuscular). El tratamiento puede consistir en una única dosis o en una pluralidad de dosis durante un periodo de tiempo.

30 Aunque es posible administrar el compuesto de la invención de forma individual, es preferible presentarlo como una formulación farmacéutica, junto con uno o más vehículos aceptables. Los vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con el compuesto de la invención y no perjudiciales para los destinatarios de los mismos. Los ejemplos de vehículos adecuados se describen con más detalle a continuación.

35 El compuesto de la invención se puede administrar solo o en combinación con otros agentes terapéuticos, la administración conjunta de dos (o más) agentes permite usar dosis significativamente más bajas de cada uno, reduciendo de ese modo los efectos secundarios observados. Por lo tanto, en una realización, el compuesto de la invención se coadministra con otro agente terapéutico para el tratamiento de lupus, para lo cual los agentes preferentes incluyen, pero sin limitación: AINE, por ejemplo naproxeno, ibuprofeno; antipalúdicos, hidroxicloroquina, cloroquina, quinacrina; corticosteroides, por ejemplo, prednisona, prednisolona, medrol; inmunosupresores: azatioprina, metotrexato, ciclofosfamida, micofenolato mofetilo, ciclosporina; otros, por ejemplo dapsona, rituximab, belimumab.

45 En una realización, el compuesto de la invención se coadministra con otro agente terapéutico para el tratamiento de la EM; Los agentes preferentes incluyen, pero sin limitación, interferón beta-1b, interferón alfa -1a, glatiramer, mitoxantrona, ciclofosfamida y corticosteroides (por ejemplo, metilprednisolona, prednisona, dexametasona). Otros agentes terapéuticos para el tratamiento de la EM incluyen fingolimod, natalizumab, alemtuzumab, dimetilfumarato y teriflunomida.

Por coadministración se incluye cualquier medio para administrar dos o más agentes terapéuticos al paciente como parte del mismo régimen de tratamiento, como será evidente para el experto en la materia. Aunque los dos o más agentes pueden administrarse simultáneamente en una sola formulación, esto no es esencial. Los agentes pueden administrarse en diferentes formulaciones y en momentos diferentes.

50 Las formulaciones pueden presentarse de manera conveniente en formas farmacéuticas de dosis unitarias y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Dichos

procedimientos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo (compuesto de la invención) con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. Por lo general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme y estrecha el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y, si es necesario, conformar el producto.

5 El compuesto de la invención se administrará normalmente por vía intravenosa, oral o por cualquier vía parenteral, en forma de una formulación farmacéutica que comprende el principio activo, opcionalmente en la forma de una adición de ácido o base orgánica o inorgánica no tóxica, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno y del paciente a tratar, así como de la vía de administración, las composiciones pueden administrarse en dosis variables.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles. Por otro lado, las composiciones pueden estar en forma de polvos estériles para la preparación extemporánea de tales soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma inyectable final debe ser estéril y debe ser efectivamente fluida para facilitar la administración con jeringa.

15 Las composiciones farmacéuticas deben ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento; por tanto, preferentemente se deben preservar contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), aceites vegetales y mezclas adecuadas de los mismos.

20 Por ejemplo, el compuesto de la invención se puede administrar por vía oral, bucal o sublingual en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada.

Las soluciones o suspensiones del compuesto de la invención adecuadas para administración oral también pueden contener excipientes, por ejemplo, N, N-dimetilacetamida, dispersantes, por ejemplo, polisorbato 80, tensioactivos y solubilizantes, por ejemplo, polietilenglicol, Phosal 50 PG (que consiste en fosfatidilcolina, ácidos grasos de soja, etanol, monoglicéridos-diglicéridos, propilenglicol y palmitato de ascorbilo),

25 Tales comprimidos pueden contener excipientes, tales como celulosa microcristalina, lactosa (por ejemplo, lactosa monohidratada o lactosa anhidra), citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato de calcio dibásico y glicina, hidroxitolueno butilado (E321), crospovidona, hipromelosa, disgregantes tales como almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), almidón glicolato sódico, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), macrogol 8000, sacarosa, gelatina y goma arábica. De manera adicional, se pueden incluir agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

30 También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferentes a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, los compuestos de la invención se pueden combinar con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o colorantes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

35 Un comprimido puede prepararse por compresión o moldeado, de manera opcional con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos de compresión pueden prepararse prensando en una máquina adecuada el principio activo en forma fluida como polvo o gránulos, mezclado opcionalmente con un aglutinante (por ejemplo, povidona, gelatina, hidroxipropilmetil celulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón, povidona reticulada, carboximetilcelulosa sódica reticulada), tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados se puede fabricar mediante moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse y pueden formularse de forma que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado.

40 Las formulaciones de acuerdo con la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas como cápsulas, sellos o comprimidos, conteniendo cada una cantidad predeterminada del principio activo; como polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso. El principio activo también puede presentarse en forma de un bolo, electuario o pasta.

45 Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden al principio activo en una base aromatizada, generalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica; y colutorios que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.

55 Debe entenderse que, además de los ingredientes particularmente mencionados en lo que antecede, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la materia teniendo en

cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, los adecuados para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica se pueden formular como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, apósitos impregnados, pulverizaciones, aerosoles o aceites, dispositivos transdérmicos, polvos para espolvorear, y similares. Estas composiciones pueden prepararse por procedimientos convencionales que contienen el agente activo. Por tanto, también pueden comprender vehículos y aditivos convencionales compatibles, tales como conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, emolientes en cremas o pomadas y etanol o alcohol oleílico para lociones. Dichos vehículos pueden estar presentes desde aproximadamente 1 % hasta aproximadamente 98 % de la composición. Más generalmente, formarán hasta aproximadamente el 80 % de la composición. Solo como ilustración, se prepara una crema o pomada mezclando cantidades suficientes de material hidrófilo y agua, que contiene de aproximadamente 5-10 % en peso del compuesto, en cantidades suficientes para producir una crema o pomada que tenga la consistencia deseada.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos, que se pretende que permanezcan en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, el agente activo puede administrarse desde el parche mediante iontoforesis.

Para aplicaciones a tejidos externos, por ejemplo, la boca y la piel, las composiciones se aplican, preferentemente, como una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el principio activo puede emplearse con una base de pomada parafínica o miscible en agua.

Como alternativa, el principio activo se puede formular en una crema con una base de aceite-en-agua o con 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, pero sin limitación, agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, prefiriéndose agua. El principio activo, dependiendo del vehículo y la concentración utilizados, puede suspenderse o disolverse en el vehículo. En la preparación de soluciones, el principio activo puede disolverse en agua para inyección y esterilizarse por filtración antes de cargarlo en un vial o ampolla adecuada y sellarlo.

Ventajosamente, agentes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes tampón pueden disolverse en el vehículo. Para aumentar la estabilidad, la composición se puede congelar después de cargar en el vial y eliminar el agua al vacío. El polvo liofilizado seco se sella luego en el vial y se puede suministrar un vial de agua para inyección que lo acompaña para reconstituir el líquido antes de su uso.

Las suspensiones parenterales se preparan sustancialmente de la misma manera que las soluciones, excepto que el principio activo se suspende en el vehículo en lugar de disolverse y la esterilización no puede realizarse por filtración. El principio activo se puede esterilizar mediante exposición a óxido de etileno antes de suspenderlo en el vehículo estéril. Ventajosamente, se incluye un agente tensioactivo o humectante en la composición para facilitar la distribución uniforme del principio activo.

El compuesto de la invención también puede administrarse usando dispositivos médicos conocidos en la materia. Por ejemplo, en una realización, una composición farmacéutica de la invención se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en los documentos U.S. 5,399,163; documento U.S. 5.383.851; documento U.S. 5.312.335; documento U.S. 5.064.413; documento U.S. 4.941.880; documento U.S. 4.790.824; o U.S. 4,596,556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: el documento US 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamentos a una velocidad controlada; el documento US 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; el documento US 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad de infusión precisa; el documento US 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; el documento US 4.439.196, que describe un sistema de administración de fármaco osmótico que tiene compartimentos de cámaras múltiples; y el documento US 4,475,196, que describe un sistema de administración de fármacos osmótico. En una realización específica, se puede administrar un análogo de hidroxinorbornilrapamicina usando una endoprótesis vascular liberadora de fármaco, por ejemplo, uno correspondiente a los descritos en el documento WO 01/87263 y publicaciones relacionadas o aquellas descritas por Perin (Perin, EC, 2005). Muchos otros implantes, sistemas de administración, y módulos, son bien conocidos de los expertos en la materia.

La dosificación a administrar de un compuesto de la invención variará de acuerdo con el compuesto particular, la enfermedad implicada, el sujeto y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y la condición física del sujeto, y la ruta de administración seleccionada. La dosificación apropiada puede determinarla fácilmente un experto en la materia. Por ejemplo, sin limitación, se puede contemplar una dosis de hasta 15 mg al día, por ejemplo de 0,1 a 15 mg al día (o una dosis más alta administrada con menos frecuencia).

Las composiciones pueden contener desde 0,1 %, por ejemplo, de 0,1-70 %, preferentemente de 5-60 %, más preferentemente de 10-30 %, de un compuesto de la invención, dependiendo del procedimiento de administración.

Un experto en la materia reconocerá que la cantidad óptima y el espaciado de las dosificaciones individuales de un compuesto de la invención se determinarán mediante la naturaleza y la extensión de la afección que se está tratando, la forma, la ruta y lugar de administración, y la edad y el estado del sujeto en particular que se está tratando, y que un médico finalmente determinará las dosis apropiadas que se utilizarán. Esta dosificación puede repetirse tan a menudo como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios, la cantidad y/o frecuencia de la dosis puede alterarse o reducirse, de acuerdo con la práctica clínica habitual.

Todos los valores en % mencionados en el presente documento son % p/p, a menos que el contexto requiera lo contrario.

Breve divulgación de las figuras

Figura 1: Efecto de la 37R-hidroxiornibornilrapamicina sobre el desarrollo de proteinuria en el modelo de lupus NZBWF1 (véase el Ejemplo 5)

Figura 2: Efecto de 37R-hidroxiornibornilrapamicina sobre los triglicéridos en el modelo de lupus NZBWF1 (véase el Ejemplo 5)

Figura 3: Efecto de la 37R-hidroxiornibornilrapamicina sobre el colesterol en el modelo de lupus NZBWF1 (véase el Ejemplo 5)

Figura 4: Estructuras de rapamicina y 37R-hidroxiornibornilrapamicina

Procedimientos generales

Una persona experta en la materia podrá determinar la farmacocinética y la biodisponibilidad del compuesto de la invención usando procedimientos *in vivo* e *in vitro* conocidos por un experto en la materia, incluidos, pero sin limitaciones, los que se describen a continuación y en Gallant-Haidner y *col.*, 2000 y Trepanier y *col.*, 1998 y referencias en el mismo. La biodisponibilidad de un compuesto se determina por una serie de factores, (por ejemplo, solubilidad en agua, permeabilidad de la membrana celular, grado de unión a proteínas y metabolismo y estabilidad) cada uno de los cuales puede determinarse mediante pruebas *in vitro* como se describe en los ejemplos del presente documento, un experto en la materia apreciará que una mejora en uno o más de estos factores conducirá a una mejora en la biodisponibilidad de un compuesto. Como alternativa, la biodisponibilidad del compuesto de la invención puede medirse usando procedimientos *in vivo* como se describe con más detalle a continuación, o en los ejemplos del presente documento.

Para medir la biodisponibilidad *in vivo*, un compuesto puede administrarse a un animal de prueba (por ejemplo, ratón o rata) tanto intraperitonealmente (i.p.) como por vía intravenosa (i.v.) y por vía oral (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. El curso temporal de la concentración en plasma a lo largo del tiempo puede usarse para calcular la biodisponibilidad absoluta del compuesto como un porcentaje usando modelos estándar. Un ejemplo de un protocolo típico se describe a continuación.

Por ejemplo, a ratones o ratas se administran dosis de 1 o 3 mg/kg del compuesto de la invención i.v. o 1, 5 o 10 mg/kg del compuesto de la invención por vía oral. Se toman muestras de sangre a intervalos de 5 minutos, 15 minutos, 1 hora, 4 horas y 24 horas, y la concentración del compuesto de la invención en la muestra se determina mediante LCMS-MS. El curso de tiempo de las concentraciones plasmáticas o en sangre total puede usarse para derivar parámetros clave, tal como el área bajo la curva de la concentración en plasma o sangre-tiempo, que es directamente proporcional a la cantidad total de fármaco inalterado que alcanza la circulación sistémica), la concentración máxima (pico) plasmática o en sangre del fármaco, el tiempo en el que se produce la concentración máxima plasmática o en sangre del fármaco (tiempo máximo), los factores adicionales que se usan en la determinación precisa de biodisponibilidad incluyen: la semivida terminal del compuesto, el aclaramiento corporal total, el volumen en equilibrio de la distribución y el % F. Estos parámetros se analizan después mediante procedimientos no compartimentales o compartimentales para dar un porcentaje de biodisponibilidad calculado, para un ejemplo de este tipo de procedimiento, véase Gallant-Haidner y *col.*, 2000 y Trepanier y *col.*, 1998, y referencias en los mismos.

La eficacia del compuesto de la invención puede analizarse en modelos *in vivo* para enfermedades neurodegenerativas que se describen en el presente documento y que son conocidos por un experto en la materia. Dichos modelos incluyen, pero sin limitación, para la enfermedad de Alzheimer: animales que expresan el precursor p-amiloide (APP) de la enfermedad de Alzheimer familiar (EAF), animales que sobreexpresan la EAF humana de tipo silvestre, animales que sobreexpresan p-amiloide 1-42(pA), animales que expresan presenilina-1 de FAD (PS-1) (por ejemplo, German y Eisch, 2004). Para la esclerosis múltiple: el modelo de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) (véase Bradl, 2003). Para la enfermedad de Parkinson, el modelo de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) o el modelo de 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) (véase, por ejemplo, Emborg, 2004; Schober A. 2004). Para la enfermedad de Huntington existen varios modelos, incluido el modelo de líneas R6 generado por la introducción del exón 1 del gen de la enfermedad de Huntington (HD) humano que porta repeticiones CAG altamente expandidas en la línea germinal del ratón (Sathasivam y *col.*, 1999) y otros (véase Hersch y Ferrante, 2004).

Materiales y procedimientos**Materiales**

A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos utilizados en los ejemplos siguientes se obtuvieron de fuentes comerciales.

- 5 El ácido (1R*,2R*,4S*)-biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico, es decir ácido (\pm)2-exo-norbornanocarboxílico se preparó mediante el procedimiento de Gu y col., 2011
 El ácido (1R, 2R, 4S)-biciclo[2.2.1] heptano-2-carboxílico se preparó por el procedimiento de Avenozza y col., 1992.
 10 El ácido (1R, 2S, 4S)-biciclo[2.2.1] heptano-2-carboxílico se preparó por el procedimiento de Avenozza y col., 1992.

Cultivo

- 15 *S. hygroscopicus* BIOT-4010 o MG2-10 se mantuvo en placas de agar de medio 1 (véase a continuación) a 28 °C. Las poblaciones de esporas se prepararon después del crecimiento en medio 1, se conservaron en 20 % p/v de glicerol: 10 % p/v de lactosa en agua destilada y se almacenaron a -80 ° C. Los cultivos vegetativos se prepararon inoculando 0,1 ml de material congelado en 50 ml de medio 2 (véase a continuación) en un matraz de 250 ml. El cultivo se incubó durante de 36 a 48 horas a 28 °C, 300 rpm.

Procedimiento de producción

Los cultivos vegetativos se inocularon a 2,5 - 5 % v/v en el medio 3. El cultivo se llevó a cabo durante 6-7 días, a 26 °C, 300 rpm.

20 Procedimiento de alimentación

La alimentación/adición de ácido (1R, 2R, 4S)-biciclo[2.2.1] heptano-2-carboxílico, ácido (1R, 2S, 4S)-biciclo[2.2.1] heptano-2-carboxílico o ácido (1R *, 2R *, 4S *) - biciclo[2.2.1] heptano-2-carboxílico (también conocido como ácido (\pm) 2-exo-norbornanocarboxílico) se llevó a cabo 24 - 48 horas después de la inoculación y se alimentó a 1-2 mM de concentración final a menos que se indique lo contrario.

25 Medio 1:

componente	Fuente	N.º de catálogo	Per l
Maíz fermentado en polvo	Sigma	C-8160	2,5 g
Extracto de levaduras	Difco	0127-17	3 g
Carbonato de calcio	Sigma	C5929	3 g
Sulfato de hierro	Sigma	F8633	0,3 g
Agar BACTO			20 g
Almidón de trigo	Sigma	S2760	10 g
Agua hasta			1 l

A continuación, el medio se esterilizó en autoclave a 121 °C, 20 min.

Medio MD6 (medio de fermentación a pequeña escala)

Componente	Per l
Toasted Nutrisoy (ADM Ingredients Ltd)	30 g
Almidón de maíz (Sigma)	30 g
Dextrina Avedex W80 (Deymer Ingredients Ltd)	19 g
Levadura (Allinson)	3 g
Sólidos de maíz fermentado (Sigma)	1 g

ES 2 664 246 T3

(continuación)

Componente	Per l
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 (monohidrato de ácido 2-morfolinoetano sulfúrico)	21,2 g
El pH se corrigió a 6,0 con NaOH 1M	

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

El medio se esterilizó durante 20 minutos a 121 ° C.

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

Medio de siembra RapV7

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

A continuación, el medio se esterilizó en autoclave a 121 °C, 20 min. Después de la autoclave se añadió d-Glucosa (hasta 10 g/l).

Medio MD6 (medio de fermentación a pequeña escala)

Componente	Per l
Toasted Nutrisoy (ADM Ingredients Ltd)	30 g
Dextrina Avedex W80 (Deymer Ingredients Ltd)	19 g
Almidón de maíz	30 g
Levadura (Allinson)	3 g
Sólidos de maíz fermentado (Sigma)	1 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g

(continuación)

Componente	Per l
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	21,2 g

El medio se ajustó a pH 6,0, se añadieron 0,4 ml/l de alfa-amilasa (Sigma A7595 - líquido, > 250 unidades/g) y el medio se esterilizó durante 30 minutos a 121 °C. Se añadieron d-fructosa (a 20 g/l) y l-lisina (monohidrocloreto) (a 2 g/l) después de esterilizar en autoclave.

5

Medio MD6/5-1 (medio de fermentación a escala media)

Componente	Per l
Toasted Nutrisoy (ADM Ingredients Ltd)	15 g
Dextrina Avedex W80 (Deymer Ingredients Ltd)	50 g
Levadura (Allinson)	3 g
Sólidos de maíz fermentado (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	0,5 ml

El medio se esterilizó durante 30 minutos a 121 ° C.

Después de la esterilización, se añadieron 15 g de fructosa por litro.

Después de 48 horas, se añadieron 0,5 g/l de L-lisina.

Procedimientos analíticos

10 Procedimiento A

Volumen de inyección: 0,005-0,1 ml (según se requiera según la sensibilidad). La HPLC se realizó con cartuchos Agilent "Spherisorb" "Rapid Resolution" SB C8, 3 micrómetros, 30 mm x 2,1 mm, con una fase móvil de:

ES 2 664 246 T3

Fase móvil A:	0,01 % de ácido fórmico en agua pura
Fase móvil B:	0,01 % de ácido fórmico en acetonitrilo
Caudal:	1 ml/minuto.

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

5 Procedimiento B

Volumen de inyección: 0,02 ml. La HPLC se realizó en una columna BDS C18 Hypersil (ThermoHypersil-Keystone Ltd) de 3 micrómetros, 150 x 4,6 mm, manteniendo 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) hasta 1 litro con agua desionizada.
10 Fase móvil B:	Agua desionizada (100 ml), ácido trifluoroacético (1 ml), acetato de amonio 1M (10 ml) hasta 1 litro con acetonitrilo.
Caudal:	1 ml/minuto.

Se utilizó un gradiente lineal de 55 % de B - 95 % de B durante 10 minutos, seguido de 2 minutos a 95 % de B, de 0,5 minutos a 55 % de B y 2,5 minutos adicionales a 55 % de B. La detección del compuesto fue por absorbancia de UV a 280 nm.

15

Procedimiento C

El sistema de HPLC comprendía un Agilent HP1100 y se realizó en una columna BDS C18 Hypersil (ThermoHypersil-Keystone Ltd) de 3 micrómetros, 150 x 4,6 mm, manteniendo a 40 °C, con una fase móvil de:

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

Este sistema se acopló a un espectrómetro de masas de electropulverización Bruker Daltonics Esquire3000. La conmutación negativa positiva se utilizó en un rango de exploración de 500 a 1000 Dalton.

Se utilizó un gradiente lineal de 55 % de B - 95 % de B durante 10 minutos, seguido de 2 minutos a 95 % de B, 0,5 minutos a 55 % de B y 2,5 minutos adicionales a 55 % de B.

Procedimiento D

Volumen de inyección: 0,025 ml. La HPLC se realizó en una columna Gemini NX C18 (Phenomenex) de 3 micrómetros, 150 x 4,6 mm, manteniendo a 50 °C, con una fase móvil de:

25

Fase móvil A:	agua desionizada con ácido fórmico (0,1 %)
Fase móvil B:	acetonitrilo con ácido fórmico (0,1 %)
Caudal:	1 ml/minuto.

Se utilizó un gradiente lineal de 55 % de B - 95 % de B durante 10 minutos, seguido de 2 minutos a 95 % de B, de 0,5 minutos a 55 % de B y 2,5 minutos adicionales a 55 % de B. La detección del compuesto fue por absorbancia de UV a 280 nm.

Procedimiento E

Fase móvil A	acetato de amonio 10 mM/agua
Fase móvil B	ACN
Columna	FluoroSep-RP Phenyl HS, 50 x 2,1 mm, 5 μm
Temperatura de columna	Ambiente
Solución de lavado con aguja de automuestreador	0,5 % de ácido fórmico en 10 % de ACN/agua
Volumen de inyección	0,012 ml
Temperatura del automuestreador	10 °C

ES 2 664 246 T3

WYE-126657 Tiempo de retención 3,8 min.
IS (WAY-130779) tiempo de retención 3,8 min.

Tiempo de ejecución total 6,7 min.

PROGRAMA GRADIENTE

Tiempo total (min)	Caudal (ml/min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)	Perfil de Gradiente
0,0	0,6	90	10	1,0
1,5	0,6	90	10	1,0
3,5	0,6	10	90	1,0
5,0	0,6	10	90	1,0
5,2	0,6	90	10	1,0
6,7	0,6	90	10	1,0

Condiciones de la espectrometría de masas
Sciex API 4000 (Número de serie: V09300509) Batman
Experimento: MRM (monitorización de reacción múltiple)

5

Fuente de iones	Cortina	CAD	GS1	GS2	IS	Temp (°C)	Ihe	EP
Turbo Spray	25	4	50	50	+5000	500	on	10

Compuesto	Transición MS/MS *	MRM	Permanencia (ms)	PF	CE	CXP
37R-hidroxiorbornilrapamicina	913,7 ± 864,6	- NH ₃ CH ₃ OH	250	76	17	18
temsirolimus (IS)	1047,6 ± 980,6	- NH ₃ -CH ₃ OH -H ₂ O	250	91	29	20
Fosfatidilcolina (efecto de matriz)	184 >184		250	150	7	5

* (M+NH₄)⁺ es ion parental.

Ejemplos

Ejemplo 1. Generación de *S. hygrosopicus* BIOT-4010 o MG2-10

10 Para la metodología para generar *S. hygrosopicus* MG2-10, consúltese el ejemplo 2 en el documento WO2004/007709. Esta cepa se puede usar en lugar de BIOT-4010 para generar 37R-hidroxiorbornilrapamicina, después de la transformación, usando protocolos estándar, on un vector que expresa *rap/JMNOL*, tal como pLL158 (documento WO2006/016167, Gregory y col., 2012).

15 BIOT-3410 es un derivado de mayor producción de la cepa productora de rapamicina *S. hygrosopicus* NRRL5491, generado por mutagénesis y selección de variantes de mayor producción y BIOT-4010 es un mutante de BIOT-3410 en el que *rapK* ha sido específicamente eliminado, utilizando una metodología similar a la descrita para *S. hygrosopicus* MG2-10. BIOT-4010 es, por lo tanto, una variante de mayor producción de *S. hygrosopicus* MG2-10, basado en la cepa seleccionada. Sin embargo, el propio *S. hygrosopicus* NRRL5491, o un derivado, se podría usar para generar una cepa capaz de producir compuestos de la invención.

20 Nuestra estrategia se aprovechó de un sitio *MfeI* de origen natural cerca del 5'-final de *rapK*. Para generar áreas de homología cadena arriba y cadena abajo para la integración, el fragmento de 7,3 kbp *NcoI* de pR19 (Schwecke y col., 1995) se clonó en pLitmus28 que se había digerido con *NcoI* y desfosforilado, y el fragmento de 4,2 kbp *NheI/PstI* del cósmido-2 (Schwecke y col., 1995) se clonó en pLitmus28 digerido con *PstI*-*SpeI*. Esto dio los plásmidos intermedios pLitmus28-7.3 y pLitmus28-4.2, respectivamente. Para introducir la eliminación deseada del

sitio *MfeI* un sitio interno de *rapK* se usaron dos oligonucleótidos para amplificar la región requerida, BioSG159: 5'-CCCCAATTGGTGTGCTCGCTCGAGAACATCGCCCGGGTGA-3' y BioSG158: 5'-CGCCGCAAGTAGCACCGCTCGGCGAAGATCTCCTGG-3' usando el plásmido pR19 como molde (Schwecke 1995). El producto de la PCR de 1,5 kbp resultante se trató con la polinucleótido quinasa de T4 y se clonó en pLitmus28 que se había digerido con *EcoRV* y desfosforilado, y el producto de la PCR clonado se secuenció. El fragmento de 1,5 kbp de *MfeI-BglII* de este plásmido se cortó y se utilizó para reemplazar el fragmento de 2,3 kbp de *MfeI-BglII* de pLitmus28-4.2. Para completar la construcción, el fragmento de 3,3 kbp de *MfeI-HindIII* de este plásmido se ligó en pLitmus28-7.3 digerido de manera similar. Finalmente, la construcción de delección se transfirió al vector de conjugación de *Streptomyces* pKC1132 (Bierman y col., 1992) como un de *HindIII/XbaI*. La construcción final se designó pSG3998.

El plásmido pSG3998 se transformó mediante electroporación en *E. coli* ET12567: pUZ8002 y se seleccionó en placas 2TY que contenían apramicina (50 ug/ml), kanamicina (25 ug/ml) y cloramfenicol (12,5 ug/ml) que se incubaron a 30 °C durante la noche. Las colonias se usaron para inocular el medio líquido 2TY (4 ml) que contenía los mismos antibióticos y se incubaron durante la noche a 30 °C y 250 rpm. Aproximadamente 0,8 ml del cultivo durante la noche se usaron para inocular 2TY (10 ml) que contenían los mismos antibióticos y se incubaron a 30 °C y 250 rpm hasta que alcanzaron una DO~ 0,5 (595 nm). Los cultivos se centrifugaron a 4000 rpm, se lavaron dos veces con 2TY y el sedimento celular resultante se resuspendió en 2TY (0,25 ml). Las esporas de BIOT-3401 se descongelaron y sedimentaron mediante centrifugación (4000 rpm) y se lavaron con 2TY (1 ml) antes de suspenderse en 2TY (1 ml). Las esporas se expusieron después a un choque térmico a 50 °C durante 10 minutos antes de colocarlas inmediatamente en hielo. Se usaron aproximadamente 100 ul de la reserva de esporas por conjugación, y se añadió 2TY (150 ul) para ajustar el volumen a 0,25 ml. Las conjugaciones se realizaron mezclando 0,25 ml de células de *E. coli* con la reserva de esporas BIOT-3401 ajustada y se esparcieron inmediatamente sobre una placa R6 seca. Las placas se secaron brevemente, se envolvieron en film transparente y se incubaron a 37 °C durante 2-3 horas. Cada placa se recubrió con agua estéril (1 ml) que contenía ácido nalidíxico (15 ul de una solución de 50 mg/l), se secó y se incubó a 37 °C durante la noche. A continuación, las placas se cubrieron con agua estéril (1 ml) que contenía apramicina (15 ul de una solución de 100 mg/l) y se incubaron a 37 °C. Las colonias exconjugantes aparecieron después de 4-7 días y se recogieron en placas de con medio 1 que contenían apramicina (50 µg/ml) y ácido nalidíxico (25 µg/ml), y se incubaron a 37 °C durante 3-4 días antes de volver a formar parches en placas con Medio 1 que contienen apramicina (50 ug/ml) y ácido nalidíxico (25 ug/ml). Este procedimiento de parchado se repitió después durante tres rondas en placas con Medio 1 sin antibióticos, incubándose a 37 °C hasta que se observó un buen crecimiento. A continuación, los parches se transfirieron a placas con Medio 1 y se incubaron a 28 °C para estimular la esporulación (~7-10 días). Las esporas se cosecharon, se filtraron a través de lana de algodón y se prepararon series de dilución. Se sembraron en placa alícuotas (100 ul) de la serie de diluciones en placas con medio 1 y se incubaron a 28 °C hasta que las esporas fueron visibles en las colonias. Las colonias se parchearon en paralelo a las placas con y sin apramicina (50 µg/ml). Las colonias sensibles a apramicina, que representan recombinantes secundarios candidatos, se cultivaron después para evaluar la producción de rapamicina. Las no productoras se analizaron adicionalmente mediante la adición de sustancias exógenas trans-4-hydroxyCHCA a los medios de producción después de 24 horas para confirmar la producción mutasintética de rapalog y verificar la interrupción deseada de *rapK*. La mejor cepa se designó BIOT-4010.

40 Ejemplo 2. Fermentación y aislamiento de los compuestos de prueba

1.1 Fermentación y aislamiento de 37R-hidroxiornbornilrapamicina

Cultivo líquido (pequeña escala)

Se usó un único tapón de agar de BIOT-4010 para inocular medio de siembra RapV7 (7 ml) en un tubo Falcon (50 ml) tapado con un tapón de espuma y cultivado a 28 °C y 300 rpm (2,5 cm) durante 48 horas. Se inocularon medios de producción de MD6 (7 ml) con este cultivo de siembra (0,5 ml) usando una punta de gran calibre y se fermentaron durante 6 días a 26 °C y 300 rpm (2,5 cm). Se añadió ácido (1R, 2R, 4S)-biciclo[2.2.1] heptano-2-carboxílico, ácido (1R, 2S, 4S)-biciclo[2.2.1] heptano-2-carboxílico o ácido (1R *, 2R *, 4S *)-biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxílico (también conocido como ácido (±) 2-exo-norbornanecarboxílico) después de un crecimiento de 24 horas en medio de producción. Las alimentaciones se prepararon típicamente como una solución madre 0,32 M en metanol y se añadieron 50 µl a cada tubo para dar una concentración final de 2 mM.

La 37R-hidroxiornbornilrapamicina resulta de la alimentación del ácido (1R, 2R, 4S)-biciclo[2.2.1] heptano-2-carboxílico y tiene un tiempo de retención de 8,4 minutos (Procedimiento D). La alimentación del ácido (1R, 2S, 4S)-biciclo[2.2.1] heptano-2-carboxílico da como resultado una hidroxiornbornilrapamicina diferente (es decir, 37S-hidroxiornbornilrapamicina) con un tiempo de retención de 8,3 minutos (procedimiento D).

Fermentación (preparativa)

Condiciones de la siembra

recipiente	Matraz Erlenmeyer de 2l (tapón de espuma tapado)
volumen de trabajo	400 ml
medio	Medio de siembra RapV7
inóculo	cantidad de reserva de esporas 0,2 ml (0,05 % v/v)
temperatura	28 °C
agitación	250 rpm, 2,5 cm tirada
aireación	aeróbico

transferencia ~ 48 h

Condiciones de fermentación

recipiente	Biorreactor de 22 l Braun Biostat C
volumen de trabajo	15 l (volumen de trabajo final, incluida la siembra)
medio	MD6/5-1
inóculo	400 ml de siembra (2,7 % v/v)
temperatura	26°C
agitación	≥ 200 rpm (control de la cascada DO ₂)
aireación	7,5 l/min de aire (0,5 v/v/m)
pH	6,40 base (NaOH) solo control 0-24 h (preprecursor) 6,90 ácido (H ₂ SO ₄) solo control > 24 h (posprecursor)
DO ₂	≥ 30 % (control de agitación en cascada)
antiespumante	automático, a demanda (SAG471)
agregar d-fructosa	después de la esterilización
agregar l-lisina	~24 h (justo antes del precursor)
añadir ácido (1R *, 2R *, 4S *) - biciclo[2.2.1]	~24 h (conc. final 2mM)
heptano-2-carboxílico (también conocido como ácido (±) 2-exo-norbornanecarboxílico)	
cosecha	título máximo del compuesto, típicamente de 132-144 h

Extracción y Purificación

5 El caldo de fermentación se clarificó mediante centrifugación (3000 rpm, 30 min) y el sobrenadante se descartó si contenía menos del 5 % de material total. El pasta celular se suspendió en acetonitrilo (2 volúmenes) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La suspensión espesa resultante se centrifugó y el sobrenadante se decantó. Se repitió este procedimiento, se combinaron los sobrenadantes y se eliminó el acetonitrilo a presión reducida a 40 °C. La suspensión espesa acuosa resultante se extrajo dos veces con un volumen igual de acetato de etilo, las fracciones orgánicas se combinaron y el disolvente se eliminó a presión reducida a 40°C. El extracto crudo resultante se analizó para determinar el contenido de 37R-hidroxiorbornilrapamicina y se almacenó a 4 °C antes de la separación cromatográfica.

10 El extracto bruto se disolvió en metanol:agua (80:20; 200-300 ml) y se extrajo dos veces con un volumen igual de hexano. La fase de metanol:agua se retuvo y el disolvente se eliminó a presión reducida a 40 °C para producir un residuo líquido viscoso. Este material se cromatografió sobre gel de sílice instantáneo (columna de 25 x 5 cm) eluyendo primero con cloroformo (1 l) y luego con volúmenes de 1 l de metanol al 1 %, 2 % y 3 % en cloroformo. Se tomaron fracciones de ~250 ml y se analizaron por HPLC. El disolvente se eliminó de las fracciones que contenían BC319 para dejar un residuo sólido. Esto se cromatografió adicionalmente sobre gel de sílice instantáneo (columna de 20 x 2,5 cm) eluyendo con acetato de etilo: hexano (1: 1). Se tomaron fracciones de ~200 ml y se analizaron por HPLC. Las fracciones que contenían el pico equivalente al ácido de alimentación (1R, 2R, 4S)-biciclo[2.2.1] heptano-2-carboxílico (véase anteriormente) se agruparon y el disolvente se eliminó para dejar un residuo sólido. Esto se cromatografió sobre gel de sílice de fase inversa (Waters XTerra C18-ODS2, tamaño de partícula de 10 micrómetros, 19 x 250 mm) eluyendo con un gradiente de agua (A) y acetonitrilo (B) a un caudal de 21 ml/min: T= 0

min, 50 % de B; T= 25 min, 100 % de B. Las fracciones que contenían el pico equivalente al ácido de alimentación (1R, 2R, 4S)-bíciclo[2.2.1] heptano-2-carboxílico (véase anteriormente) se combinaron y el disolvente se eliminó al vacío para proporcionar 37R-hidroxinorbornilrapamicina.

Ejemplo 3 - Bioensayos *In vitro* para la inhibición de la S6 quinasa en líneas celulares Jurkat

- 5 Se analizó la 37R-hidroxinorbornilrapamicina para la inhibición de la fosforilación del sustrato de mTOR, S6K, en la línea de linfocitos T humanas Jurkat. Los linfocitos T Jurkat T se trataron con 37R-hidroxinorbornilrapamicina, CCI-779 (temsirolimus) o rapamicina durante 4 horas a 37 °C. Las células se cosecharon y se lisaron, y se analizaron cantidades iguales de lisado celular mediante transferencia Western. En este ensayo, la 37R-hidroxinorbornilrapamicina mostró una inhibición similar o más potente de la fosforilación de S6K en Thr 389, en comparación con otros análogos de rapamicina, como se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1

Compuesto	Inhibición de S6 quinasa (CI50, nM)
37R-hidroxinorbornilrapamicina	0,19
CCI-779	0,24
Rapamicina	0,45

Ejemplo 4 - Análisis farmacocinético

- La farmacocinética de 37R-hidroxinorbornilrapamicina se caracterizó en ratas Sprague Dawley macho. Cada grupo consistió en 4 animales en ayunas. Se administró a un grupo una dosis intravenosa en bolo único de aproximadamente 7,5 mg/kg de artículo de ensayo disuelto en DMSO/PEG200 al 80 %. El otro grupo recibió una única dosis oral de 32,8 mg/kg disuelta en 0,2 % de Tween-80, 0,7 % de etanol y 9,1 % de propilenglicol. Las muestras se tomaron a las 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas y se extrajeron de la siguiente manera. Las muestras se extrajeron mediante alícuotas (0,05 ml) de sangre y se colocaron muestras de control de calidad en pocillos individuales de una placa de 96 ml de 2 ml que se colocó en hielo. Se añadió una alícuota de 50 µl de agua a cada pocillo que contenía la muestra. Se añadió una alícuota de 10 µl de solución de adición a los patrones correspondientes y 10 µl de ACN a las muestras de verificación de control de calidad. A continuación, la placa se agitó suavemente en vórtice para mezclar. Después, se transfirió la placa de 96 pocillos a un Tomtec Quadra 96-320 para la extracción de la muestra. Se añadió un volumen de 400 µl de ACN que contenía WAY-130799 (patrón interno) a 100 ng/ml a cada pocillo que contenía una muestra y un blanco único (excluidas las muestras en blanco doble). Se extrajeron muestras dobles en blanco con ACN que no contenía IS. La placa se sometió a agitación vortical durante 4 minutos y, luego, las muestras se centrifugaron a 3400 rpm durante 5 minutos. Se transfirió un volumen de 400 µl de sobrenadante de cada muestra a una placa limpia y el líquido se evaporó bajo N₂ a 35 °C. Las muestras se reconstituyeron en 150 µl de 30 % de ACN/agua. Las muestras se analizaron luego mediante el procedimiento E y se cuantificaron frente a una curva estándar. A partir de los datos obtenidos, los valores de PK se pudieron calcular mediante procedimientos por un experto en la materia (véase procedimientos generales).

La Tabla 2 muestra los parámetros farmacocinéticos calculados a partir de este estudio.

Tabla 2

Compuesto	T1/2 (h)	F% (biodisponibilidad)	Cmáx (ng/ml)	Vss (l/kg)
37R-hidroxinorbornilrapamicina	7,2	14,1	215	17,1

- En comparación, la semivida de la rapamicina en ratas es de aproximadamente 31 horas ([http://www.ema.europa.eu/docs/en](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Discussion/human/000273/WC500046434.pdf) GB/document library/EPAR -Scientific Discussion/human/000273/WC500046434.pdf).

Como puede verse a partir de los datos, la 37R-hidroxinorbornilrapamicina exhibe una semivida más corta en comparación con la rapamicina en ratas y se puede esperar que lo haga de forma similar en seres humanos. Se prevé que la 37R-hidroxinorbornilrapamicina tendrá una mayor biodisponibilidad que la rapamicina.

Ejemplo 5 - Evaluación en un modelo NZBWF1 *in vivo* de LES

- 40 El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la 37R-hidroxinorbornilrapamicina, un inhibidor del objetivo mamífero de la rapamicina (mTOR), en el modelo de ratón NZBWF1/J de lupus eritematoso sistémico. CCI-779 (temsirolimus), otro inhibidor de mTOR utilizado como un comparador positivo, es eficaz en la mejora de la enfermedad en este modelo. En resumen, Se trató a ratas NZBWF1/J hembra de 26 semanas de edad diariamente por vía oral durante 14 semanas con vehículo (Phosal), CCI-779 o 37R-hidroxinorbornilrapamicina a 1, 5 o 10 mg/kg.

Se obtuvo la mitad de cada riñón y se introdujo en formalina tamponada neutra al 10 % para el procesamiento histológico de rutina. Además, la otra mitad de cada riñón se congeló en medio OCT® y se sometió a tinción inmunohistoquímica para IgG, IgM y C3. Se examinaron las secciones de tejido renal teñidas con hematoxilina y eosina (H y E) y ácido periódico de Schiff (PAS; con contratinción con hematoxilina) y las secciones de tejido renal teñidas inmunohistoquímicamente para IgG, IgM y C3 (con contratinción de hematoxilina).

Para cada sección de tejido renal teñida con H y E de cada animal, se contaron los números totales de focos inflamatorios y cilindros proteináceos intratubulares (es decir, hialinos) en ambos riñones. Cuando los focos inflamatorios se habían fusionado, el número de focos individuales se evaluó contando el número de focos de aproximadamente 100 células que contribuían a los focos fusionados. La morfometría se realizó en secciones de tejido renal teñidas con PAS de cada animal usando un paquete de software de análisis de imagen comercial (Image-Pro Plus v.5.1, Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Para cada sección de tejido teñida con PAS de cada animal, se tomaron cinco (5) fotomicrografías de 40 aumentos a color a una resolución de 1388 X 1040 usando un Zeiss AxioImager. Microscopio A1 y una cámara de microscopio digital Zeiss AxioCam HRc. Se tomaron fotomicrografías de los glomérulos en cada corteza renal, con 1 o 2 glomérulos en cada fotomicrografía. Se evaluó un total de 10 glomérulos por animal (5 por riñón) morfométricamente trazando manualmente la circunferencia de un ovillo glomerular y determinando el área total de dicho ovillo, el área total de material nuclear azul en dicho ovillo y el área total de material rosa oscuro (interpretado como material positivo para PAS) en dicho ovillo. Todas las áreas se capturaron como píxeles totales que cumplen los criterios preestablecidos para ese parámetro. La tinción inmunohistoquímica para IgG, IgM y C3 dentro de los glomérulos se evaluó subjetivamente como ninguna (0), ligera (1), leve (2), moderada (3) o intensa (4). Se evaluaron los números medios de grupos de focos inflamatorios y cilindros proteináceos en el riñón y las puntuaciones medias de los grupos para la morfometría glomerular y la tinción inmunohistoquímica para IgG, IgM y C3 dentro de los glomérulos. Los resúmenes de los medios de los grupos para focos inflamatorios y cilindros proteináceos en el riñón; la morfometría glomerular; y la tinción inmunohistoquímica para IgG, IgM y C3 dentro de los glomérulos; se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Resumen de las medias de grupos para inflamación, cilindros proteináceos, parámetros morfométricos glomerulares y tinción inmunohistoquímica

Tratamiento	Phosal	37R-hidroxinorbornilrapamicina			
		CCI-779	10 mg/kg	5 mg/kg	1 mg/kg
Focos inflamatorios renales totales	23,5 ± 3,6	3,4 ± 1,0	2,3 ± 0,6	4,3 ± 1,1	11,9 ± 2,2
Cilindros proteináceos totales	28,4 ± 16,4	2,1 ± 0,8	2,8 ± 0,9	1,0 ± 0,5	44,3 ± 41,3
Área nuclear	46819 ± 12832	32894 ± 6273	35605 ± 7321	36790 ± 6561	36416 ± 7421
Área mesangial positiva para PAS	38417 ± 16053	18394 ± 4024	18641 ± 5997	21265 ± 5017	23112 ± 9058
Área glomerular total	168844 ± 44633	117415 ± 17281	122924 ± 17315	124261 ± 17397	141360 ± 42237
Puntuación de tinción de IgG en el riñón	3,4 ± 0,3	0,1 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2	2,3 ± 0,2
Puntuación de tinción de IgM en el riñón	3,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	2,2 ± 0,3	2,5 ± 0,3	3,7 ± 0,2
Puntuación de tinción de C3 en el riñón	2,9 ± 0,4	1,1 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,8 ± 0,3

Los hallazgos microscópicos en ratones tratados con Phosal eran infiltrados de células inflamatorias mononucleares en los riñones; cilindros proteináceos en túbulos renales; glomérulos grandes con celularidad aumentada y matriz mesangial positiva para PAS aumentada; y abundante tinción inmunohistoquímica para IgG, IgM y C3 dentro de los glomérulos. El tratamiento con CCI-779 a 10 mg/kg dio como resultado medias de grupo sustancialmente más bajas para todos los parámetros evaluados para todos estos hallazgos. El tratamiento con 37R-hidroxinorbornilrapamicina a niveles de dosis similares o menores (5 y 10 mg/kg) también dio como resultado medias de grupos sustancialmente menores para todos los parámetros en comparación con el tratamiento con Phosal. Los efectos beneficiosos de 37R-hidroxinorbornilrapamicina a 5 o 10 mg/kg fueron generalmente similares a los de CCI-779 (a 10 mg/kg), véase la Figura 1. La 37R-hidroxinorbornilrapamicina en este ensayo, a todos los niveles de dosis, incluyendo 10 mg/kg, la 37R-hidroxinorbornilrapamicina también exhibió un aumento reducido en los niveles de

colesterol y triglicéridos (Figura 2 y Figura 3). Esto revela que, a los niveles de dosis requeridos para una eficacia similar a CCI-779, la 37R-hidroxiornbornilrapamicina conduce a una reducción de la hiperlipidemia, uno de los principales efectos secundarios de la rapamicina, CCI-779 y análogos de rapamicina similares.

Ejemplo 6 - Evaluación de la inhibición *in vitro* de FKBP12

- 5 El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la 37R-hidroxiornbornilrapamicina, frente a FKBP12, un objetivo para la actividad neuroregenerativa de las rapamicinas, utilizando un ensayo de PPlasa.

Compuesto	Ki (nM) de FKBP12 PPlasa	% de CV
37R-hidroxiornbornilrapamicina	3,9 ± 0,41	11
Rapamicina	5,4 ± 0,35	6
FK506	7,0 ± 1,0	-
37S-hidroxiornbornilrapamicina	8,7 ± 0,7	8

Los valores de Ki se presentan como ± error estándar y el % CV es el coeficiente de variación.

Como puede verse a partir de los datos, la 37R-hidroxiornbornilrapamicina inhibe la actividad PPlasa de FKBP12 con más potencia que la rapamicina, FK506 y el isómero 37S-hidroxiornbornilrapamicina.

- 10 El ejemplo siguiente, Ejemplo 7, se proporciona solo con fines informativos.

Ejemplo 7 - Evaluación de la actividad antitumoral *in vitro* en un ensayo monocapa

El fin de este estudio fue evaluar la capacidad de la 37R-hidroxiornbornilrapamicina para inhibir las líneas celulares cancerosas de glioblastoma, SF268 y U87MG y las líneas celulares de cáncer de próstata DU145 y PC3. Los datos para 37R-hidroxiornbornilrapamicina y rapamicina son la media de dos ciclos.

	CI70 contra línea celular cancerosa (µM)			
	SF268	U87MG	DU145	PC3
37R-hidroxiornbornilrapamicina	2,2	2,7	2,5	0,1
Rapamicina	2,7	10,0	4,0	1,3
CCI-779 (Torisel)	No analizado	No analizado	16,3	13,7

- 15 Como puede verse, la 37R-hidroxiornbornilrapamicina es más potente que la rapamicina y el CCI-779 para inhibir el crecimiento de las células cancerosas en un ensayo monocapa.

Referencias:

- Alperovich, G., Rama, I., Lloberas, N., Franquesa, M., Poveda, R., Gomà, M., Herrero-Fresneda, I., Cruzado, JM., Bolanos, N., Carrera, M., Grinyó, JM., and Torras, J. (2007) "New immuno suppressor strategies in the treatment of murine lupus nephritis", *Lupus*, 16:18-24.
- 20 Alvarez, 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.
- An, W.L., R.F. Cowburn, y col. (2003). "Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6 kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease." *Am J Pathol* 163(2): 591-607.
- 25 Andexer, J., Kengrew, S.G., y col., (201 1) "Biosynthesis of the immunosuppressants FK506, FK520 and rapamycin involves a previously undescribed family of enzymes acting on chorismate", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:4776-4781.
- Aranow, C., and Ginzler, EM. (2000) "Epidemiology of cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus", *Lupus*, 9:166-169.
- 30 Avenoza, A., y col. (1992), "Asymmetric synthesis of exo-norbornane-2-carboxylic acids", *Tetrahedron: asymmetry*, 3: 343-346.
- Avramut, M. and Achim, C.L. (2002). "Immunophilins and their ligands: insights into survival and growth of human neurons." *Physiol Behav* 77(4-5): 463-8.
- 35 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.

- Bove, J., Martinez-Vicente, M., and Vila, M. (2011) "Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights", *Nature Reviews Neuroscience*, 12:437-452.
- 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,
- 5 Bradl M., Hohlfeld R. (2003), "Molecular pathogenesis of neuroinflammation". *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 74:1364-70.
- Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis., G., Aradhye, S., and Burtin, P. (2010) "Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis", *Nat. Rev. Drug Discovery*, 9:883-898.
- 10 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". *EM BO Journal* 15: 5256-5267.
- 15 Buttmann, M. (2010) "Treating multiple sclerosis with monoclonal antibodies: a 2010 update", *Expert Rev. Neurother* 10:791-809.
- Cao, W., and Konsolaki, M. (2011) "FKBP immunophilins and Alzheimer's disease: A chaperoned affair", *J. Biosci.*, 36:493-498.
- 20 Chambraud, B. y col., (2010) "A role for FKBP52 in Tau protein function", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:2658-2663.
- Chang, S.M., P. Wen, y col. (2005). "Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme." *Invest New Drugs* 23(4): 357-61.
- Compston, A., & Coles, A. (2002) "Multiple sclerosis", *Lancet*, 359:1221-1231.
- 25 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.
- Cummins, C.L., Jacobsen, W., Christians, U., Benet, L.Z., (2004) "CYP3A4-Transfected Caco-2 Cells as a Tool for Understanding Biochemical Absorption Barriers: Studies with Sirolimus and Midazolam", *The Journal of Pharmacology*, 308(1), 143-155
- 30 Dancey, J.E., (2002), "Clinical development of mammalian target of rapamycin inhibitors" *Hematol Oncol Clin N Am*, 16, 1101-1114.
- Deleersnijder, A. y col., (2011) "Comparative analysis of different peptidyl-prolyl isomerases reveals FK506-binding protein 12 as the most potent enhancer of α -synuclein aggregation". *J. Biol Chem.* 286:26687-26701
- 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". *AntiCancer Drugs*, 6, 522-532.
- 35 Donia, M., Mangano, L., Amoroso, A., Mazzarino, MC., Imbesi, R., Castrogiovanni, P., Coco, M., Meroni, P, and Nicoletti, F. (2009). "Treatment with rapamycin ameliorates clinical and histological signs of protracted relapsing experimental allergic encephalomyelitis in Dark Agouti rats and induces expansion of peripheral CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells", *J. Autoimmun.*, 33:135-140.
- Dumont, F.J. and Su, Q.X. (1995). "Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin". *Life Sciences* 58(5): 373-395.
- 40 Emborg M.E., (2004) "Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies" *J Neurosci Methods*, 139(2):121-43;
- Esposito, M., Ruffini, F., Bellone, M., Battaglia, M., Martino, G., and Furlan, R. (2010). "Rapamycin inhibits relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by both effector and regulatory T cells modulation". *J. Neuroimmunol.*, 220:52-63
- 45 (Fernandez, D., Bonilla, E., Mirza, N., Niland, B., and Perl, A. (2006) "Rapamycin reduces disease activity and normalizes T cell activation-induced calcium fluxing in patients with systemic lupus erythematosus," *Arthritis & Rheumatism*, 54:2983-2988.
- Fernandez, D., and Perl, A. (2009) "Metabolic control of T-cell activation and death in SLE", *Autoimmun. Rev.*, 8:184-189.
- 50 Fernandez, DR., Talarico, T., Bonilla, E., Li, Q., Banerjee, S., Middleton, FA., Phillips, PE., Crow, MK., Oess, S., Muller-Esterl, W., and Perl, A. (2009), "Activation of mTOR controls the loss of TCRzeta in lupus T cells through HRES-1/Rab4-regulated lysosomal degradation", *J. Immunol.*, 182:2063-2073.
- 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.
- 55 Findlay J.A, and Radics, L. (1980) *Canadian Journal of Chemistry* 58:579.
- Francis, L., and Perl, A. (2009) "Pharmacotherapy of systemic lupus erythematosus", *Expert Opinon in Pharamacotherapy*, 10:1481-1494.
- 60 Gallant-Haidner H.L., Trepanier D.J., Freitag D.G., Yatscoff R.W. (2000), "Pharmacokinetics and metabolism of sirolimus". *Ther Drug Monit.* 22(1), 31-5.
- Garber, K. (2008) "Infections cast cloud over Novartis' over MS therapy", *Nature Biotech.* 8:844-845.
- Gerard, M. y col., (2010) "Inhibition of FK506 Binding Proteins Reduces α -Synuclein Aggregation and Parkinson's Disease-Like Pathology", *J. Neurosci.* 30(7):2454-2463
- 65 Gerard, M., Deleersnijder, A., Demeulemeester, J., Debyser, Z., and Baekelandt, V. (2011) "Unraveling the Role of Peptidyl-Prolyl Isomerases in Neurodegeneration", *Mol. Neurobiol.*, 44:13-27.

- German D.C. and Eisch A.J., (2004), "Mouse models of Alzheimer's disease: insight into treatment", *Rev Neurosci*, 15:353-69.
- Goodin, D. S. y col. (2002) "Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines", *Neurology*, 58:169-178.
- Gorman, C., and Isenberg, D. (2004) "Editorial: Atherosclerosis and lupus", *Rheumatology*, 43:943-945.
- 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.
- Gregory M.A., Gaisser S, Lill R.E., Hong H, Sheridan R.M., Wilkinson B, Petkovic H, Weston A.J., Carletti I, Lee H.L., 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
- Gregory M.A., Kaja A.L., Kendrew S.G., Coates N.G., Warneck N., Nur-E-Alam M., Lill R.E., Sheehan L.S., Chudley L., Moss S.J., Sheridan R.M., Quimpere M., Zhang M.-Q., Martin C.J., Wilkinson B. (2012) "Structure guided design of improved antiproliferative rapalogs through biosynthetic medicinal chemistry". *Chem. Sci*. DOI: 10.1039/C2SC21833J
- Gu, J. y col. (2011) "Practical large-scale preparation of (\pm)-2-exo-norbornyl carboxylic acid and its improved isolation as the sodium salt", *Org. Process Res. Dev.*, 15: 942-945.
- Hersch S.M. and Ferrante R.J., (2004), "Translating therapies for Huntington's disease from genetic animal models to clinical trials", *NeuroRx*. 1(3):298-306
- Huang, S. and Houghton, P.J., 2002. "Mechanisms of resistance to rapamycins". *Drug Resist. Update*, 4(6), 378-391.
- Huang, S., Bjornsti, M. A. and Houghton P.J. (2003). "Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance." *Cancer Biol Ther* 2(3): 222-32.
- Jacobs, L. D. y col. (1996) "Intramuscular interferon β -1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG)", *Ann. Neurol.*, 39:285-294.
- Johnson, K. P. y col. (1995) "Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group", *Neurology*, 45:1268-1276.
- Kahan, B.D., Chang, J.Y., and Sehgal, S.N. (1991) "Preclinical evaluation of a new potent immunosuppressive agent, rapamycin". *Transplantation* 52: 185-191.
- Kang, CB., Ye, H., Dhe-Paganon, S., and Yoon, HS. (2008) "FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions", *Neurosignals*, 16:318-325.
- Kappos, L., Bathhof, F., Desmet, A., Trenblay, G., Brault, Y., Edan, G., Montalban, X., Polna, C., Pozzilli C., "The effect of oral temsirolimus on new magnetic resonance imaging scan lesions, brain atrophy, and the number of relapses in multiple sclerosis: results from a randomised, controlled trial". Oral abstract 0158. European Neurological Society Meeting. 18-22 June 2005. Vienna, Austria.
- Kingwell, E. y col. (2010) "Cardiotoxicity and other adverse events associated with mitoxantrone treatment for MS", *Neurology*, 74:1822-1826.
- 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.
- Kuhn B., Jacobsen W., Christians U., Benet L.Z., Kollman P.A. (2001), "Metabolism of sirolimus and its derivative everolimus by cytochrome P450 3A4: insights from docking, molecular dynamics, and quantum chemical calculations". *J Med Chem*. 44(12), 2027-34.
- 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.
- Lampen A., Zhang Y., Hackbarth I., Benet L.Z., Sewing K.F., Christians U. (1998) "Metabolism and transport of the macrolide immunosuppressant sirolimus in the small intestine". *J Pharmacol Exp Ther*. 285(3), 1104-12.
- 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.
- Laplanche A., Demeule M., Murphy G.F., Beliveau R. (2002) "Interaction of immunosuppressive agents rapamycin and its analogue SDZ-RAD with endothelial P-gp". *Transplant Proc*. 34(8), 3393-5.
- Lee, J.-S., Paull, K., Alvarez, 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.
- Lee J.K., Bussey K.J., Gwadry F.G., Reinhold W., Riddick G., Pelletier S.L., Nishizuka S., Szakacs G., Annereau J.P., Shankavaram U., Lababidi S., Smith L.H., Gottesman M.M., Weinstein J.N. (2003) "Comparing cDNA and oligonucleotide array data: concordance of gene expression across platforms for the NCI-60 cancer cells". *Genome Biol*. 4(12), R82.
- Li, A.P. (1992) "Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery". *Drug Discovery Today*, 6, 357-366.
- Lowden, P.A.S., (1997) Ph.D. Dissertation, University of Cambridge. "Studies on the biosynthesis of rapamycin".
- Lublin, FD., Baier, M., and Cutter, G. (2003) "Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis", *Neurology*, 61:1528-1532.
- Lui, SL., Tsang, R., Chan, RW., Zhang, F., Tam, S., Yung, S., and Chan, TM. (2008) "Rapamycin attenuates the

- severity of established nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice", *Nephrol. Dial. Transplant*, 23:2768-2776.
- Lui, S.L., Yung, S., Tsang, R., Zhang, F., Chan, K.W., Tam, S., and Chan, T.M. (2008b) "Rapamycin prevents the development of nephritis in lupus-prone NZB/W F1 mice", *Lupus*, 17:305-313.
- 5 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. (1999). "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 NMR assignments for rapamycin". *Journal of Antibiotics* 44: 688-690.
- 10 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.
- Mok, C.C. (2010) "Update on emerging drug therapies for systemic lupus erythematosus", *Expert Opinion in Emerging Drugs*, 15:53-70.
- Moraal y col., (2010) "Long-interval T2-weighted subtraction magnetic resonance imaging: A powerful new outcome measure in multiple sclerosis trials", *Annals of Neurology*, 67: 667-675.
- 15 Morrisett, J.D., Abdel-Fattah, G., Hoogeveen, R., Mitchell, E., Ballantyne, C.M., Pownall, H.J., Opekun, A.R., Jaffe, J.S., Oppermann, S., and Kahan, B.D. (2002) "Effects of sirolimus on plasma lipids, lipoprotein levels, and fatty acid metabolism in renal transplant patients", *J. Lipid Research*, 43:1170-1180.
- 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.
- 20 Niino, M. & Sasaki, H. (2010) "Update on the treatment options for multiple sclerosis", *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 6:77-88.
- Nishida H, Sakakibara T, Aoki F, Saito T, Ichikawa K, Inagaki T, Kojima Y, Yamauchi Y, Huang LH and Guadiana MA (1995) "Generation of novel rapamycin structures by microbial manipulations" *J Antibiot. (Tokyo)* 48(7), 657-666.
- 25 Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., and Weinshenker, B.G. (2000) "Multiple sclerosis", *N. Engl. J. Med.* 343:938-952.
- 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.
- 30 Pardridge, (2005), "The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development", *NeuroRx*, 2, 3-14
- Patti, F. (2010) "Optimizing the benefit of multiple sclerosis therapy: the importance of treatment adherence", *Patient Prefer. Adherence*, 4:1-9.
- Perin, E.C., (2005), "Choosing a Drug-Eluting Stent: A Comparison Between CYPHER and TAXUS", *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 6 (suppl 1), ppS13-S21.
- 35 Persidis A. (1999), "Cancer multidrug resistance" *Nat Biotechnol.* 17: 94-5
- Perl, A., Gergely, P Jr., Nagy, G., Koncz, A., and Banki, K. (2004) "Mitochondrial hyperpolarization: a checkpoint of T cell life, death and autoimmunity", *Trends Immunol.*, 25:360-367.
- Petri, M., Perez-Gutthann, S., Spence, D., and Hochberg, M.C. (1992) "Risk factors for coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus", *Am. J. Med.*, 93:513-519.
- 40 Poten J. y col., (1968), "Long term culture of normal and neoplastic human glia." *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 74: 465-86
- PRISMS Study Group. (1998) "Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon β -1a in relapsing/remitting multiple sclerosis", *Lancet* 352:1498-1504.
- 45 Putzki, N. y col., (2010) "Natalizumab reduces clinical and MRI activity in multiple sclerosis patients with high disease EP 2 797 929 B1 activity: results from a multicentre study in Switzerland", *Eur. Neurol.*, 63:101-106.
- Raught B., Gingras, A-C. and Sonenberg, N.; (2001), "The target of rapamycin (TOR) proteins", *PNAS*, 98(13): 7037-7044
- Ravikumar, B., R. Duden, y col. (2002). "Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy." *Hum Mol Genet* 11(9): 1107-17.
- 50 Reather, J. A., (2000), Ph.D. Dissertation, University of Cambridge. "Late steps in the biosynthesis of macrocyclic lactones".
- Rice, G.P. y col. (2001) Interferon in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD002002.
- Rosati, G. (2001) "The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update", *Neurol. Sci.* 22:117-139.
- 55 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 H.H., Burger A.M. (eds). *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development. Contrib. Oncol.*, 54: 145 - 156.
- Ruan, B. y col., (2008) "Binding of rapamycin analogs to calcium channels and FKBP52 contributes to their neuroprotective effects", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:33-38.
- 60 Reddy, P.S., Legault, H.M., Sypek, J.P., Collins, M.J., Goad, E., Goldman, S.J., Liu, W., Murray, S., Dorner, A.J., and O'Toole, T. (2008) "Mapping similarities in mTOR pathway perturbations in mouse lupus nephritis models and human lupus nephritis", *Arthritis Research & Therapy*, 10:R127.
- Sathasivam, K., C. Hobbs, y col. (1999). "Transgenic models of Huntington's disease." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354(1386): 963-9
- 65 Sedrani, R., Cottens, S., Kallen, J., and Schuler, W. (1998) "Chemical modifications of rapamycin: the discovery of SDZ RAD". *Transplantation Proceedings* 30: 2192-2194.
- 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.

Schober A. (2004), "Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP" *Cell Tissue Res*, 318(1):215-24).

5 Shim, S. y col., (2009) "Peptidyl-prolyl isomerase FKBP52 controls chemotropic guidance of neuronal growth cones via regulation of TRPC1 channel opening", *Neuron*, 64:471-483.

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.

10 Steinman, L. (2005) "Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab", *Nature Rev. Drug Discov.*, 4:510-518.

Stylianou, K., Petrakis, I., Vasiliki Mavroei, V., Stratakis, S., Vardaki, E., Perakis, K., Stratigis, S., Passam, A., Papadogiorgaki, E., Giannakakis, K., Nakopoulou, L., and Daphnis, E. (2011) "The PI3K/Akt/mTOR pathway is activated in murine lupus nephritis and downregulated by rapamycin", *Nephrol. Dial. Transplant*, 26:498-508.

15 Szakacs G., Annereau J.P., Lababidi S., Shankavaram U., Arciello A., Bussey K.J., Reinhold W., Guo Y., Kruh G.D., Reimers M., Weinstein J.N., Gottesman M.M. 2004, "Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells". *Cancer Cell*. 6(2):129-37.

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

20 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

The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. (1993) "Interferon β -1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial", *Neurology* 43:655-661.

25 Trepanier D.J., Gallant H., Legatt D.F., Yatscoff R.W. (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.

30 Vignot S, Faivre S, Aguire D, Raymond E (2005) "mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives", *Ann Oncol* 16: 525-537.

Volpe, D.A., Faustino, P.J., Yu, L.X., (2001) "Towards standardisation of an in vitro method of drug absorption". *Pharmacoepial Forum*, 27, 2916-2922.

Warner, LM., Adams, LM., and Sehgal, SN. (1994) "Rapamycin prolongs survival and arrests pathophysiologic changes in murine systemic lupus erythematosus", *Arthritis Rheum.*, 37:289-297.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biotica Technology Limited

<120> NUEVO ANÁLOGO DE RAPAMICINA

<130> BOA-P1304PCT

<150> GB1122305.4

40 <151> 23/12/2011

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 37

45 <212> ADN

<213> Plásmido

<400> 1

cccccaattgg tgtcgtcga gaacatcgcc cgggtga 37

<210> 2

50 <211> 36

<212> ADN

<213> Plásmido

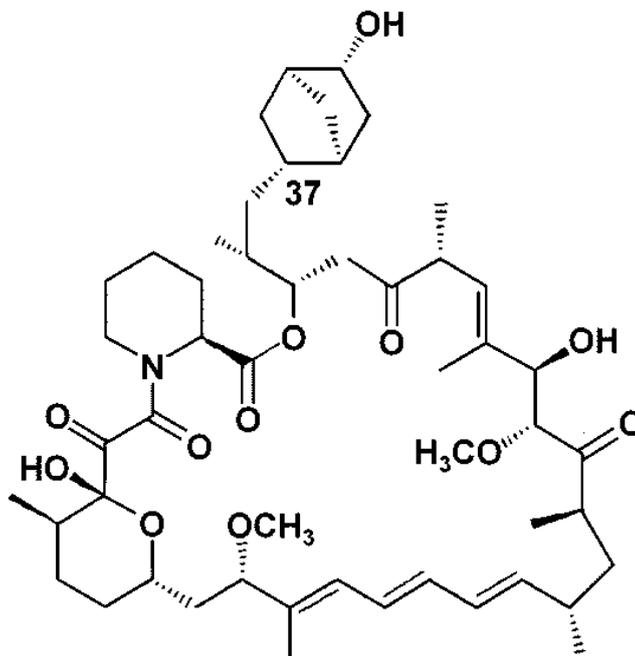
<400> 2

cgccgcaagt agcaccgctc ggccaagatc tcctgg 36

55

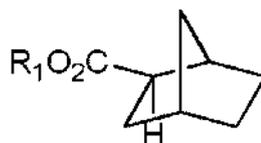
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



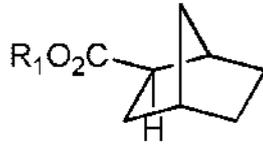
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en forma sustancialmente pura.
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso como un producto farmacéutico.
4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 10 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, en la que dicha composición comprende un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, junto con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables en la que el compuesto de fórmula (I) está presente en la composición en una cantidad de al menos 95 % p/p del contenido de policétido de la composición.
6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento del lupus.
- 15 7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.
8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en terapia.
9. Un procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende alimentar un ácido iniciador de fórmula (II)

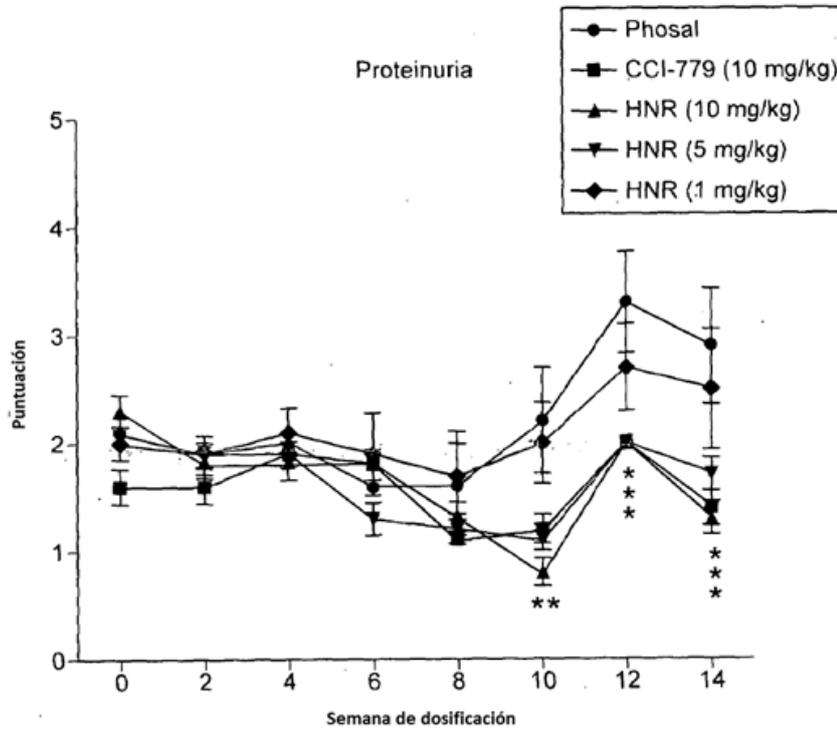


20 en la que R₁ representa H o un grupo alquilo, a una cepa de *Streptomyces hygroscopicus* que se ha alterado genéticamente para eliminar o inactivar el gen *rapK* o un homólogo del mismo.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, que comprende las etapas de
- (i) alimentar un ácido iniciador de fórmula (II)



en la que R_1 representa H o un grupo alquilo, a una cepa de *Streptomyces hygrosopicus* que se ha alterado genéticamente para eliminar o inactivar el gen *rapK* o un homólogo del mismo; e
(ii) aislar y purificar el compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



* p < 0,05 frente al vehículo
 ** p < 0,05 frente al control positivo y el vehículo

HNR = 37R-hidroxinorbonilrapamicina

FIG. 1

Efecto de la 37R-hidroxi norbonilrapamicina sobre los triglicéridos en el modelo de lupus NZBWF1

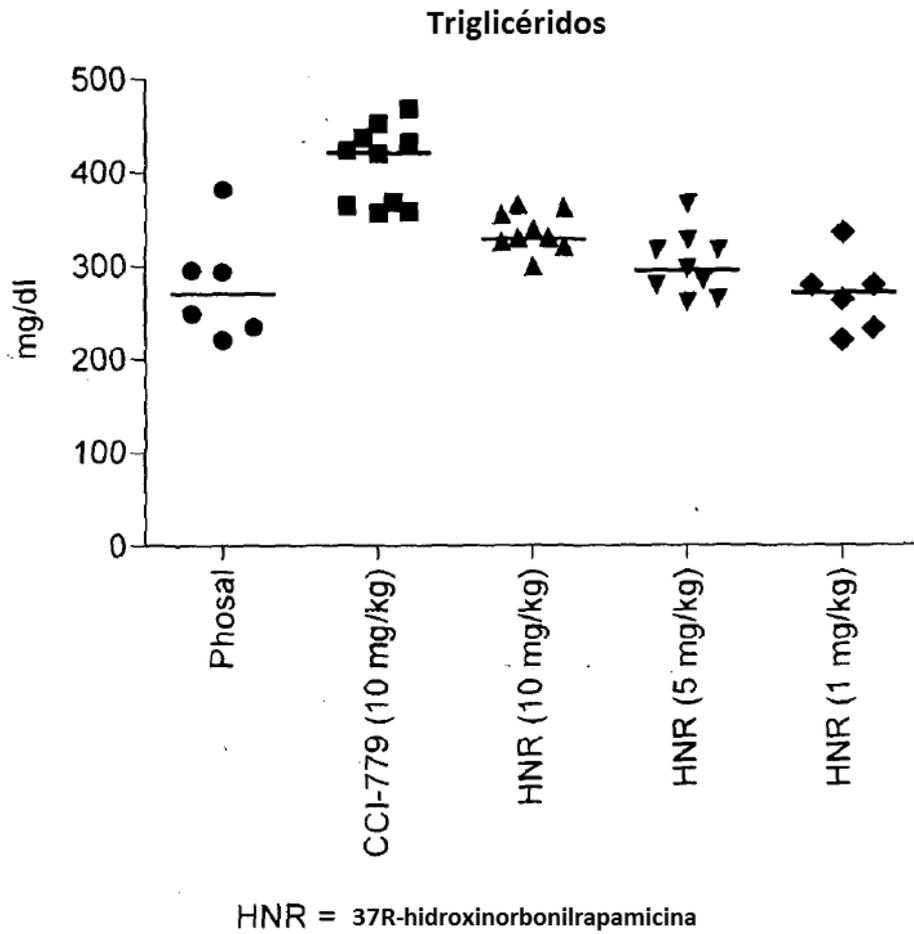


FIG. 2

Efecto de la 37R-hidroxinorbonilrapamicina sobre el colesterol en el modelo de lupus NZBWF1

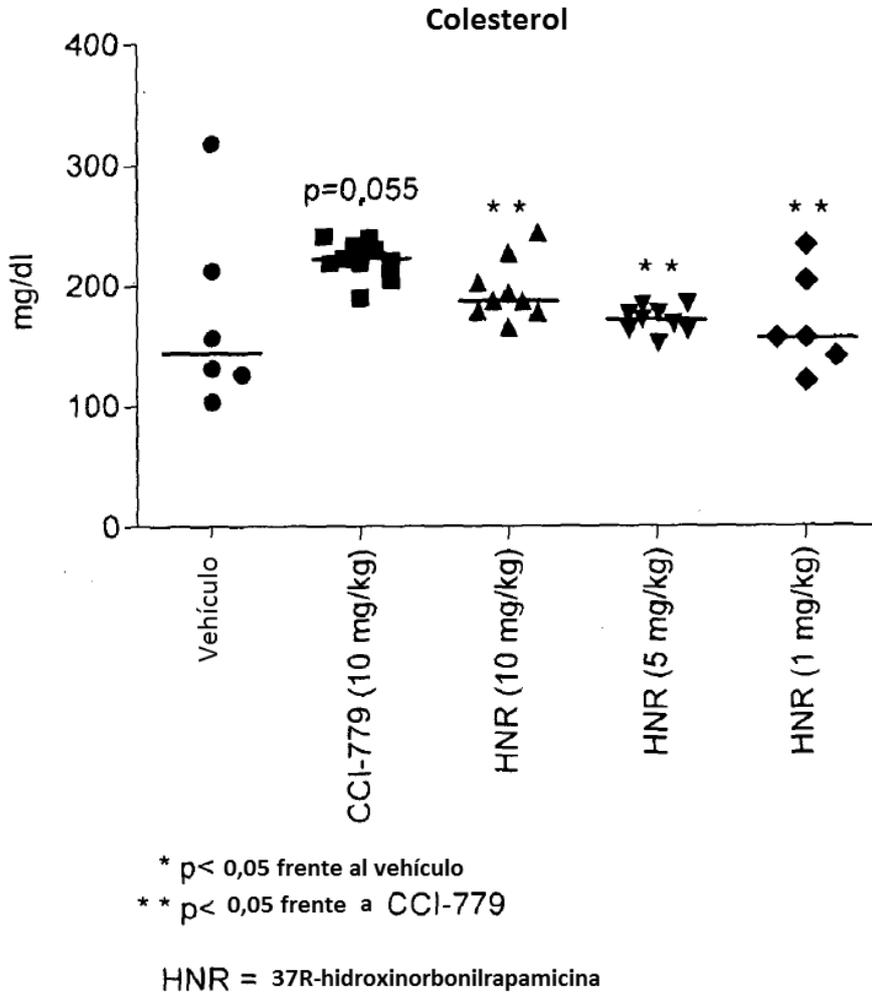


FIG. 3

Rapamicina y 37R-hidroxinorbonilrapamicina

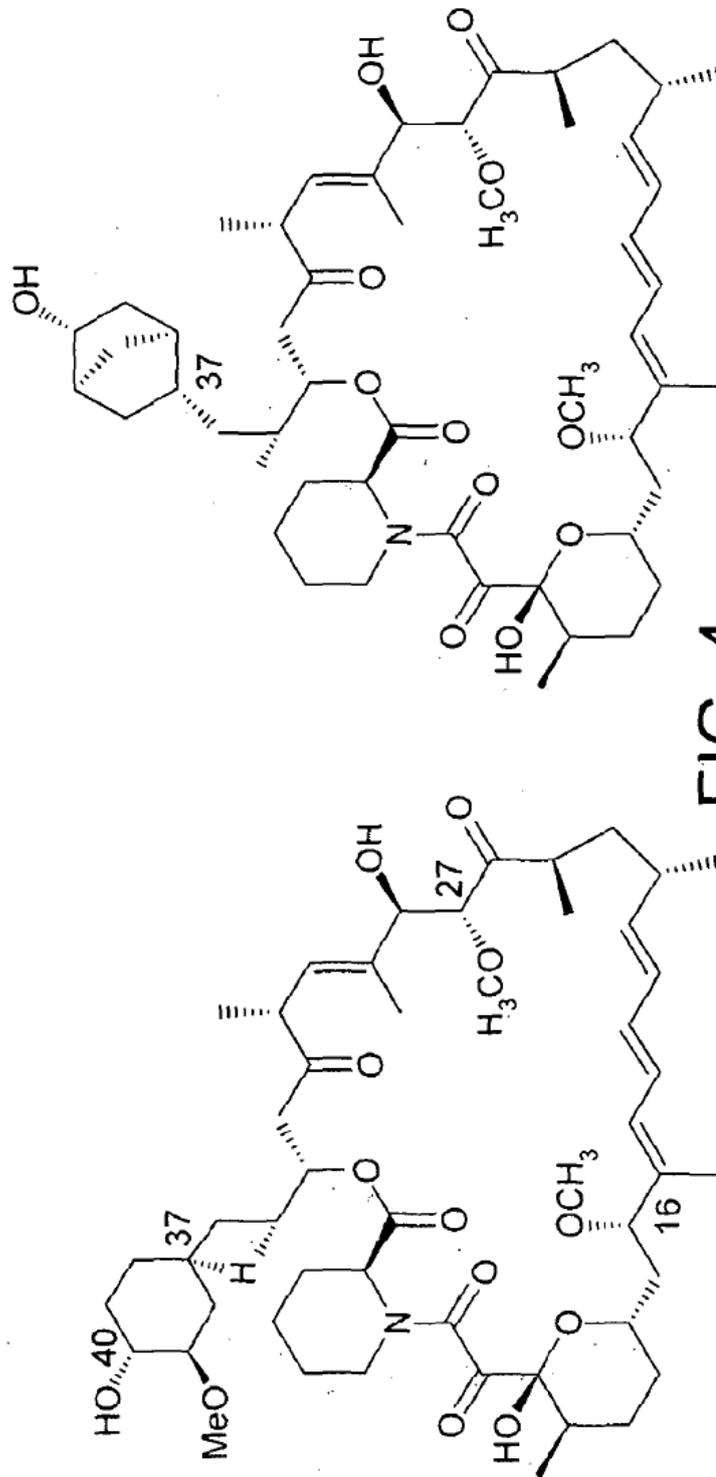


FIG. 4