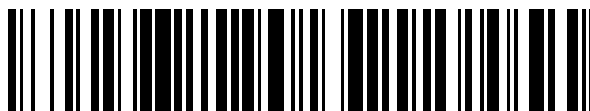


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 716**

51 Int. Cl.:
A61K 31/343 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01)
C07D 493/22 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05724487 .3**
96 Fecha de presentación: **02.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1732536**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.12.2006**

54 Título: **Derivados en el anillo de lactona de triptolida como inmunomoduladores y agentes anticáncer**

30 Prioridad:
02.03.2004 US 549769 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.07.2012

73 Titular/es:
**Pharmagenesis, Inc.
303 Twin Dolphin Drive, Suite 600
Redwood City, CA 94065, US**

72 Inventor/es:
**YUAN, Hongwei;
MUSSER, John H. y
DAI, Dongcheng**

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 385 716 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados en el anillo de lactona de triptolida como inmunomoduladores y agentes anticáncer

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos útiles como agentes inmunosupresores, antiinflamatorios y anticáncer.

10 Referencias

- Gleichmann, E. *et al.*, *Immunol. Today* **5**:324 (1984).
 He, Q. *et al.*, *Beijing Da Xue Xue Bao* **35**:252-5 (Junio 2003).
 Korngold, R. y Sprent, J., *J. Exp. Med.* **148**:1687 (1978).
 15 Krishna, G. *et al.*, *Am. J. of Pathology* **158**(3):997-1004 (Marzo 2001).
 Kupchan, S.M. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **94**:7194 (1972).
 Kupchan, S.M. *et al.*, Patente en EE UU No. 4.005.108 (1977).
 Lipsky *et al.*, Patente en EE UU No. 5.294.443 (1994).
 Ma *et al.*, *J. Chin. Pharm. Sci.* **1**:12 (1992).
 20 Murase, N. *et al.*, *Transplantation* **55**:701 (1993).
 Ono y Lindsey, *J. Thor. Cardiovasc. Surg.* **57**(2):225-29 (1969).
 Panchagnula, R. y Thomas, N.S., *Intl J of Pharmaceutics* **201**(2):131-150 (2000).
 Pu, L. *et al.*, *Zhongguo Yaoli Xuebao* **11**:76 (1990).
 Wang, J. y Morris, R.E., *Transplantation Proc.* **23**:699 (1991).
 25 Wang, X. *et al.*, Publicación PCT No. WO 2002/17931 (2002).
 Zhou, Y.X. *et al.*, *Ai Zheng* **21**(10):1108-8 (Octubre 2002).

Antecedentes de la invención

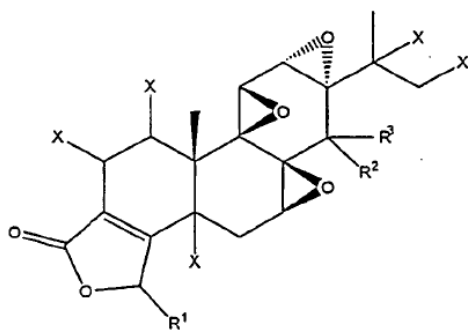
- 30 Los agentes inmunosupresores se usan ampliamente en el tratamiento de la enfermedad autoinmune y en el tratamiento o prevención de rechazo a trasplantes, incluyendo el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH). Los agentes inmunosupresores comunes incluyen azatioprina, corticosteroides, ciclofosfamida, metotrexato, 6-mercaptopurina, vincristina y ciclosporina A. En general, ninguno de estos fármacos son eficaces por completo, y la mayoría están limitados por grave toxicidad. Por ejemplo, la ciclosporina A, un agente muy usado, es
 35 significativamente tóxico para el riñón. Además, las dosis necesarias para el tratamiento eficaz pueden aumentar la susceptibilidad del paciente a la infección por una variedad de invasores oportunistas.

- Se han identificado el compuesto triptolida, obtenido de la planta medicinal china *Tripterygium wilfordii* (TW), y ciertos derivados y profármacos del mismo, como que tienen actividad inmunosupresora, por ejemplo, en el
 40 tratamiento de la enfermedad autoinmune y en el tratamiento o prevención de rechazo de trasplantes, incluyendo la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH). Véanse, por ejemplo, las patentes en EE UU con cotitularidad Nos. 5.962.516 (Compuestos inmunosupresores y métodos), 5.843.452 (Composición y método de inmunoterapia), 5.759.550 (Método para la supresión del rechazo de xenoinjertos), 5.663.335 (Compuestos inmunosupresores y métodos), 5.648.376 (Compuesto diterpeno inmunosupresor) y 6.150.539 (Profármacos de triptolida que tienen alta
 45 solubilidad acuosa). También se ha descrito que la triptolida y ciertos derivados y profármacos de la misma muestran actividad anticáncer; véase, por ejemplo, Kupchan *et al.*, 1972, 1977, así como la patente en EE UU con cotitularidad No. 6.620.843 (Septiembre 2003).

- Aunque los derivados y profármacos de triptolida han proporcionado beneficios respecto a la triptolida nativa en áreas tales como farmacocinética o biodistribución, por ejemplo, en virtud de diferencias en la solubilidad lipídica o acuosa, o a través de su actividad como profármacos, la actividad biológica por sí de los derivados de triptolida con frecuencia es significativamente menor que la de la triptolida nativa.

55 Compendio de la invención

En un aspecto, la invención proporciona compuestos que son útiles para terapia inmunosupresora, antiinflamatoria y anticáncer. Los compuestos son derivados de triptolida representados por la fórmula I:



I

donde

R¹ es alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, arilo, arilacilo o C(OH)R⁴R⁵,

en donde R⁴ y R⁵ son independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo o cicloalquenilo, cualquiera de los cuales, excepto hidrógeno, puede estar sustituido con alcoxi, hidroxilo, aciloxi o arilo;

CR²R³ es CHOH o C=O, y

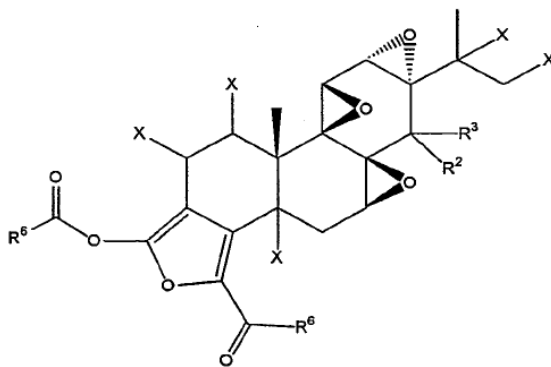
como máximo uno de los grupos X es hidroxilo, y los restantes grupos X son hidrógeno.

En formas de realización preferidas de la estructura I, CR²R³ es CHOH, que preferiblemente tiene la configuración β-hidroxilo. En formas de realización adicionales, cada grupo X es hidrógeno.

Preferiblemente, cada uno de dichos grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi y aciloxi presentes en un compuesto de estructura I incluye como máximo cuatro átomos de carbono, cada uno de dichos grupos cicloalquilo y cicloalquenilo incluye como máximo seis átomos de carbono, y cada uno de dichos grupos arilo es monocíclico y no heterocíclico (es decir, consiste en átomos de hidrógeno y carbono).

En formas de realización seleccionadas de la estructura I, R¹ es alquilo, alquenilo o C(OH)R⁴R⁵, donde, preferiblemente, cada uno de R⁴ y R⁵ es independientemente hidrógeno, alquilo o alquenilo. En formas de realización adicionales, R¹ es alquilo, preferiblemente alquilo de C₁-C₃, o hidroxialquilo. En una forma de realización, R¹ es metilo. En otra forma de realización, R¹ es arilacilo, preferiblemente benzoilo (C(O)C₆H₅).

En un aspecto relacionado, la invención proporciona compuestos de estructura II:



II

donde

cada R⁶ se selecciona independientemente de alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo;

CR²R³ es CHOH o C=O;

como máximo uno de los grupos X es hidroxilo, y los restantes grupos X son hidrógeno.

En formas de realización preferidas de la estructura II, CR²R³ es CHOH, que preferiblemente tiene la configuración β-hidroxilo. En formas de realización adicionales, cada grupo X es hidrógeno.

Preferiblemente, cada uno de dichos grupos alquilo, alqueniilo y alquinilo, presentes en un compuesto de estructura II incluye como máximo cuatro átomos de carbono, cada uno de dichos grupos arilo es monocíclico y no heterocíclico; por ejemplo, fenilo sustituido o sin sustituir.

- 5 En formas de realización seleccionadas de la estructura II, cada R⁶ es arilo; preferiblemente, cada R⁶ es fenilo sin sustituir.

10 En otro aspecto, la invención proporciona agentes para su uso en un método de realizar inmunosupresión en un sujeto, administrando a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto que tiene la estructura I o II como se ha descrito anteriormente. En un aspecto adicional, la invención proporciona agentes para su uso en un método de inducir apoptosis en una célula, que es útil en terapia antiproliferativa, especialmente en terapia anticáncer. Según este método, la célula se pone en contacto con una cantidad eficaz de un compuesto que tiene la estructura I o II como se describe anteriormente. De forma alternativa, la invención abarca la utilidad de un compuesto de estructura I o II para realizar inmunosupresión o para inducir apoptosis en una célula, o para la preparación de un medicamento para realizar inmunosupresión o para inducir apoptosis en una célula. El compuesto típicamente se proporciona en un soporte farmacéuticamente aceptable. Las formas de realización específicas de los métodos y usos pueden emplear cualquiera de las formas de realización específicas de las fórmulas I y II como se describe anteriormente.

20 Estos y otros objetos de la invención serán más completamente aparentes cuando se lea la siguientes descripción detallada de la invención junto con las figuras acompañantes.

Breve descripción de las figuras

25 La figura 1 muestra el efecto citotóxico en células Jurkat de un compuesto de la invención, 19-metil triptolida (designado PG795), en comparación con triptolida (designada PG490) (ejemplo 3);

30 La figura 2 muestra el efecto citotóxico en células Jurkat de un compuesto de la invención 18-desoxo-19-deshidro-18-benzoiloxi-19-benzoil triptolida (designado PG796), en comparación con triptolida 14-succinato (designado PG490-88), con y sin preincubación en suero de ratón o humano (ejemplo 3);

La figura 3 muestra la inhibición de la producción de IL-2 en células Jurkat por un compuesto de la invención, 19-metil triptolida (designado PG795), en comparación con triptolida (ejemplo 4); y

35 La figura 4 muestra la inhibición de la producción de IL-2 en células Jurkat por PG796, en comparación con triptolida 14-succinato, con y sin preincubación en suero de ratón o humano (ejemplo 4).

Descripción detallada de la invención

40 I. Definiciones

“Alquilo” se refiere a un radical monovalente acíclico saturado que contiene carbono e hidrógeno, que puede ser lineal o ramificado. Los ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, n-butilo, t-butilo, n-heptilo e isopropilo. “Cicloalquilo” se refiere se refiere a un radical monovalente cíclico completamente saturado que contiene carbono e hidrógeno, que puede estar además sustituido con alquilo. Los ejemplos de grupos cicloalquilo son ciclopropilo, metilciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, etilciclopentilo y ciclohexilo. “Alquilo inferior” se refiere a tal grupo que tiene de uno a seis átomos de carbono, preferiblemente de uno a cuatro átomos de carbono.

50 “Alqueniilo” se refiere a un radical monovalente acíclico que contiene carbono e hidrógeno, que puede ser lineal o ramificado, y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono (C=C). “Alquinilo” se refiere a un radical monovalente acíclico que contiene carbono e hidrógeno, que puede ser lineal o ramificado, y que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono (C≡C). “Alqueniilo inferior” o “alquinilo inferior” es tal grupo que tiene de dos o seis átomos de carbono, preferiblemente de dos a cuatro átomos de carbono.

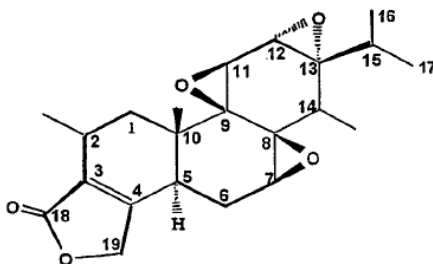
55 “Acilo” se refiere a un radical que tiene la forma $-(C=O)R$, donde R es alquilo (alquilacilo) o arilo (arilacilo). “Aciloxi” se refiere a un grupo que tiene la forma $-O(C=O)R$.

60 “Arilo” se refiere a un radical aromático monovalente que tiene un único anillo (por ejemplo, benceno) o dos anillos condensados (por ejemplo, naftilo). Como se usa en el presente documento, arilo es preferiblemente monocíclico y carbocíclico (no heterocíclico), por ejemplo, un anillo de benceno (fenilo) o anillo de benceno sustituido. Mediante “sustituido” se quiere decir que uno o más hidrógenos del anillo se sustituyen con un grupo tal como un halógeno (por ejemplo, flúor, cloro o bromo), alquilo inferior, nitro, amino, alquilamino inferior, hidroxilo, alcoxi inferior o halo(alquilo inferior).

65 “Aralalquilo” se refiere a un sustituyente alquilo, preferiblemente alquilo inferior (C₁-C₄, más preferiblemente C₁-C₂), que está sustituido además con un grupo arilo; ejemplos son bencilo y fenetilo.

Un "heterociclo" se refiere a un anillo no aromático, preferiblemente un anillo de 5 a 7 miembros, cuyos átomos de anillo se seleccionan del grupo que consiste en carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre. Preferiblemente, los átomos de anillo incluyen de 3 a 6 átomos de carbono. Tales heterociclos incluyen, por ejemplo, pirrolidina, piperidina, piperazina y morfolina.

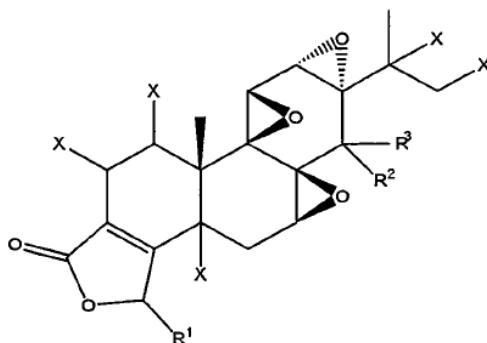
Para los fines de la presente divulgación, se usa el siguiente esquema de numeración para triptolida y derivados de triptolida:



II. Derivados de triptolida

Los compuestos de la invención son derivados de triptolida o triptolidas hidroxiladas, resultantes de la alquilación o acilación del anillo furanoide (lactona), como se describe posteriormente.

Más específicamente, la invención proporciona compuestos representados por la estructura I:



donde

R^1 es alquilo, alquenilo, alquinilo, arilalquilo, arilo, arilacilo o $C(OH)R^4R^5$,

en donde R^4 y R^5 son independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, alquenilo o cicloalquenilo, cualquiera de los cuales, excepto hidrógeno, puede estar sustituido con alcoxi, hidroxilo, aciloxi o arilo;

CR^2R^3 es $CHOH$ o $C=O$, y

como máximo uno de los grupos X es hidroxilo, y los restantes grupos X son hidrógeno.

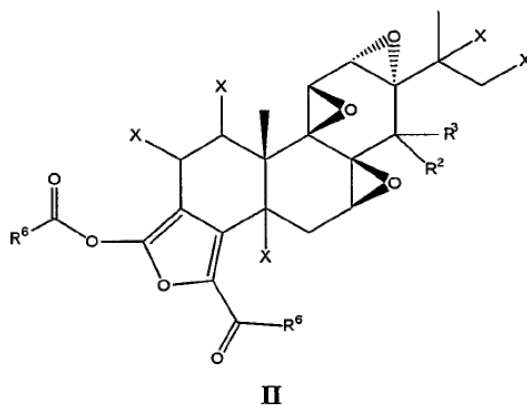
En formas de realización preferidas de la estructura I, CR^2R^3 es $CHOH$, que preferiblemente tiene la configuración β -hidroxilo.

Preferiblemente, cada X es hidrógeno; sin embargo, en formas de realización seleccionadas, exactamente uno de los grupos X indicados es hidroxilo. Las localizaciones preferidas para la sustitución de hidroxilo incluyen los carbonos 2 y 16, como se muestra en el sistema de numeración anteriormente.

Preferiblemente, cada uno de dichos grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi y aciloxi presentes en un compuesto de estructura I incluye como máximo cuatro átomos de carbono, cada uno de dichos grupos cicloalquilo y cicloalquenilo incluye como máximo seis átomos de carbono, y cada uno de dichos grupos arilo es monocíclico y no heterocíclico.

En formas de realización seleccionadas de la estructura I, R^1 es alquilo, alqueniilo, alquinilo, arilalquilo, arilo o $C(OH)R^4R^5$, preferiblemente, alquilo, alqueniilo o $C(OH)R^4R^5$, donde, preferiblemente, cada uno de R^4 y R^5 es independientemente hidrógeno, alquilo o alqueniilo. En formas de realización adicionales, R^1 es alquilo, preferiblemente alquilo de C_1-C_3 , o hidroxialquilo. En una forma de realización, que incluye el compuesto designado en el presente documento como PG795, R^1 es metilo. En otras formas de realización, que incluyen el compuesto 19-benzoil triptolida, R^1 es arilacilo, preferiblemente benzoilo.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona compuestos de estructura II:



donde

cada R^6 se selecciona independientemente de alquilo, alqueniilo, alquinilo o arilo;

CR^2R^3 es $CHOH$ o $C=O$;

como máximo uno de los grupos X es hidroxilo, y los restantes grupos X son hidrógeno.

En formas de realización preferidas de la estructura II, CR^2R^3 es $CHOH$, que preferiblemente tiene la configuración β -hidroxi. Preferiblemente, cada X es hidrógeno; sin embargo, en formas de realización seleccionadas, exactamente uno de los grupos X indicados es hidroxilo. Las localizaciones preferidas para la sustitución de hidroxilo incluyen los carbonos 2 y 16, como se muestra en el esquema de numeración anteriormente.

Preferiblemente, cada uno de dichos grupos alquilo, alqueniilo y alquinilo, presentes en un compuesto de estructura II incluye como máximo cuatro átomos de carbono, cada uno de dichos grupos arilo es monocíclico y no heterocíclico; por ejemplo, fenilo sustituido o sin sustituir.

En formas de realización seleccionadas de la estructura II, cada R^6 es arilo, preferiblemente, cada R^6 es fenilo. Esto incluye el compuesto designado en el presente documento como PG796, donde cada R^6 es fenilo sin sustituir.

A. Preparación

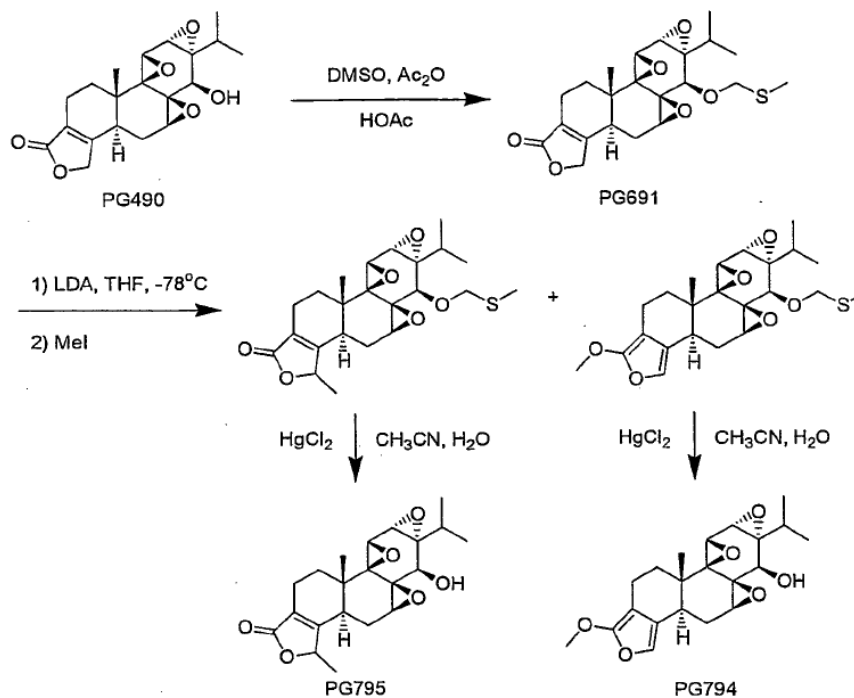
Los compuestos de la invención se pueden preparar a partir de triptolida o sus derivados hidroxilados. Los últimos incluyen triptolida (2-hidroxi triptolida) y 16-hidroxi triptolida, que, junto con triptolida, se pueden obtener del xilema de la raíz de la planta medicinal china *Tripterygium wilfordii* (TW) o de otras fuentes conocidas. La planta TW se encuentra en la provincia de Fujian y otras provincias del sur de China; el material de la planta TW en general se puede obtener en China o a través de fuentes comerciales en los Estados Unidos. Los métodos para preparar triptolida, triptolida y 16-hidroxitriptolida se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Kupchan *et al.* (1972, 1977); Lipsky *et al.* (1994); Pu *et al.* (1990); y Ma *et al.* (1992).

El derivado 5-hidroxi de triptolida se puede preparar mediante oxidación con dióxido de selenio de triptolida, como se describe en la solicitud provisional en EE UU con cotitularidad número de serie 60/532.702. Brevemente, en una preparación típica, se agita una solución de triptolida y aproximadamente 2,2 equivalentes de dióxido de selenio en dioxano a aproximadamente 90°C con N_2 durante 72 horas.

La incubación de triptolida con *Cunninghamella blakesleana*, como describen L. Ning *et al.* (*Tetrahedron* **59**(23):4209-4213, 2003) produce los derivados hidroxilados anteriores así como 1-hidroxitriptolida, triptolidenol (15-hidroxitriptolida), 19 α -hidroxitriptolida y 19 β -hidroxitriptolida.

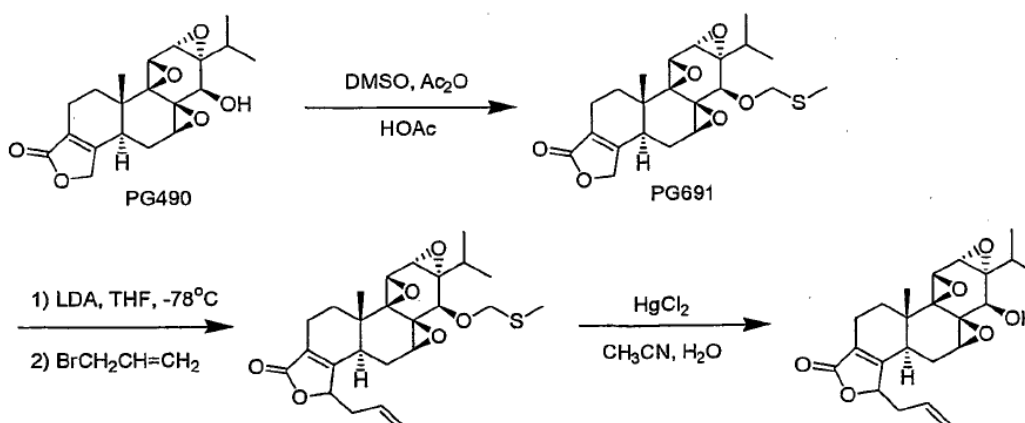
Los compuestos de fórmula I se pueden preparar mediante la reacción de triptolida protegida con hidroxilo con una base fuerte, tal como LDA, seguido por la alquilación del intermedio enolato. Como se muestra en el esquema 1 a continuación, donde se usó yoduro de metilo para la alquilación, también se puede formar el alcóxido de furano isomérico. Como se describe en el ejemplo 1, estos compuestos se aislaron y desprotegeron por separado mediante reacción con cloruro mercúrico.

5



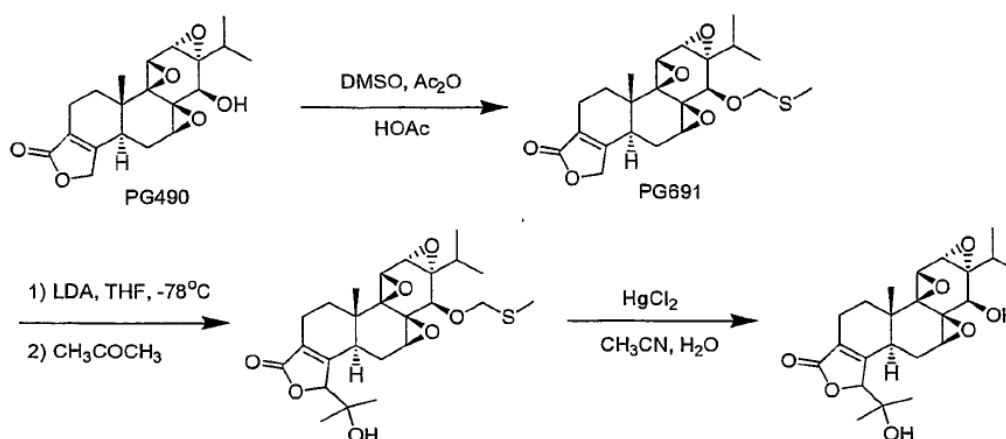
10

El esquema a continuación ilustra el uso de bromuro de alilo como agente alquilante, para dar un compuesto de fórmula I en el que $R^1 = \text{alilo } (-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)$. De forma similar, se empleó bromuro de bencilo para dar un compuesto de fórmula I en el que $R^1 = \text{bencilo } (-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)$.

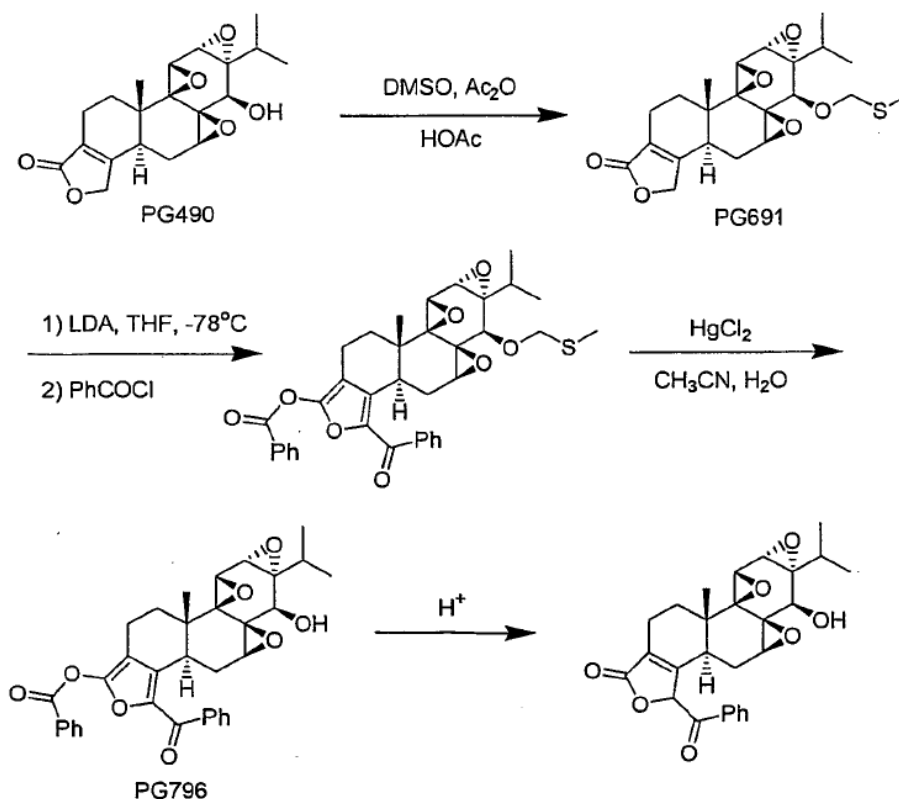


15

La reacción del enolato intermedio con una cetona, como se muestra a continuación, se puede usar para generar un sustituyente alcohol, es decir, un compuesto de fórmula I en el que R^1 es $\text{C}(\text{OH})\text{R}^4\text{R}^5$.



5 Los compuestos de fórmula II se puede preparar mediante la reacción del enolato intermedio con un exceso de un reactivo acilante, tal como un haluro de acilo, como se muestra en el esquema siguiente. El compuesto disustituido, en este caso, se puede hidrolizar con un ácido acuoso para generar la enona conjugada monoderivada.



B. Actividad biológica

10 Se evaluó la actividad citotóxica de un compuesto de fórmula I, 19-metil triptolida (designado PG795) y un
 15 compuesto de fórmula II, 18-desoxo-19-deshidro-18-benzoiloxi-19-benzoil triptolida (designado PG796) usando un
 ensayo MTT estándar, como se describe en el ejemplo 3. Se evaluó la actividad inmunosupresora de estos
 compuestos en un ensayo de inhibición de IL-2 estándar, como se describe en el ejemplo 4. Los resultados de estos
 ensayos se muestran en las figuras 1-4.

PG975 mostró actividad significativa en ambos ensayos, como se muestra en las figuras 1 y 3, aunque fue menos
 activo que triptolida (designada PG490 en las figuras).

PG796 mostró un nivel más alto de actividad en ambos ensayos que el profármaco conocido, triptolida 14-succinato (designado PG490-88), como se muestra en las figura 2 y 4. En particular, triptolida 14-succinato incubado en suero humano fue mucho menos activo en estos ensayos que triptolida 14-succinato incubado en suero de ratón, mientras que PG976 mostró actividad alta, y esencialmente equivalente, en ambos casos. (Se espera que la incubación convierta triptolida 14-succinato a triptolida y PG796 al compuesto monoderivado, 19-benzoil triptolida, mostrado en el esquema de síntesis anterior).

Además, PG796 mostró actividad casi equivalente cuando no se incubó, lo que sugiere que el compuesto es activo en su forma original (es decir, sin hidrolizar).

III. Composiciones terapéuticas

Las formulaciones que contienen los derivados de triptolida de la invención pueden tomar la forma de formas posológicas sólidas, semisólidas, en polvo liofilizado, o líquidas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, soluciones, suspensiones, emulsiones, pomadas, lociones o aerosoles, preferiblemente en formas posológicas unitarias para la administración sencilla de las dosis precisas. Las composiciones típicamente incluyen un soporte o excipiente farmacéutico convencional y pueden incluir además otros agentes médicos, soportes o adyuvantes.

Preferiblemente, la composición incluye aproximadamente del 0,5% al 75% en peso de un compuesto o compuestos de la invención, el resto consiste en excipientes farmacéuticos adecuados. Para la administración oral, tales excipientes incluyen grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares. Si se desea, la composición también puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes o tampones.

La composición se puede administrar a un sujeto por vía oral, transdérmica o parenteral, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. Para su uso en una preparación líquida oral, la composición se puede preparar como una solución, suspensión, emulsión o jarabe, suministrándose bien en forma líquida o en una forma seca adecuada para la hidratación en agua o solución salina normal. Para la administración parenteral, una composición inyectable para la administración parenteral típicamente contendrá el derivado de triptolida en una solución intravenosa adecuada, tal como solución salina fisiológica estéril.

Las composiciones líquidas se pueden preparar disolviendo o dispersando el derivado de triptolida (aproximadamente desde el 0,5% hasta aproximadamente el 20%) y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un soporte farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, solución salina acuosa, dextrosa acuosa, glicerol o etanol, para formar una solución o suspensión.

El compuesto también se puede administrar por inhalación, en forma de partículas de aerosol, sólidas o líquidas, preferiblemente de tamaño respirable. Tales partículas son lo suficientemente pequeñas para pasar a través de la boca y la laringe tras la inhalación y a los bronquios y alveolos de los pulmones. En general, las partículas que varían desde aproximadamente 1 a 10 micrómetros de tamaño, y preferiblemente de menos de aproximadamente 5 micrómetros de tamaño, son respirables. Las composiciones líquidas para inhalación comprenden el agente activo dispersado en un soporte acuoso, tal como solución salina estéril sin pirógenos o agua estéril sin pirógenos. Si se desea, la composición se puede mezclar con un propelente para ayudar a rociar la composición y formar un aerosol.

Los métodos para preparar tales formas posológicas son conocidas o serán aparentes para los expertos en la materia; por ejemplo, véase, Remington's Pharmaceutical Sciences (20ª Ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2000). La composición que se va a administrar contendrá una cantidad del compuesto seleccionado en una cantidad eficaz para realizar la inmunosupresión en un sujeto o apoptosis en una célula diana.

Como se describe, por ejemplo, en Panchagnula *et al.* (2000), el coeficiente de reparto o logP de un agente farmacéutico puede afectar su idoneidad para varias vías de administración, incluyendo la biodisponibilidad oral. Se espera que los compuestos descritos en el presente documento, en virtud de la sustitución de flúor por uno o más grupos hidroxilo, tengan valores de logP calculados mayores que el compuesto parental, triptolida, lo que los hace mejores candidatos para la disponibilidad oral.

IV. Tratamiento inmunomodulador y antiinflamatorio

Por tanto, la invención incluye la utilidad de los compuestos de la invención como agentes inmunosupresores, es decir, como un auxiliar a procedimientos de trasplante o en tratamientos de enfermedad autoinmune. Los compuestos de la invención son eficaces para inhibir respuestas inmunes, tal como la producción de citoquinas, en células u organismos. Como se muestra en las figuras 3-4, un compuesto de fórmula I, 19-metil triptolida (designado PG795) y un compuesto de fórmula II, 18-desoxo-19-deshidro-18-benzoiloxi-19-benzoil triptolida (designado PG796), inhibieron la producción de IL-2 en células Jurkat (véase, el ejemplo 4) de una manera dependiente de la dosis.

- 5 Se ha mostrado que existen anomalías inmunorreguladoras en una amplia variedad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas, incluyendo lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide crónica, diabetes melitus de tipo I y II, enfermedad inflamatoria del intestino, cirrosis biliar, uveítis, esclerosis múltiple y otros trastornos tales como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, penfigoide bulloso, sarcoidosis, psoriasis, ictiosis, oftalmopatía de Graves y asma. Aunque la patogénesis subyacente de cada una de estas afecciones puede ser bastante diferente, tienen en común la aparición de una variedad de autoanticuerpos y linfocitos autorreactivos. Tal autorreactividad se puede deber, en parte, a una pérdida de los controles homeostáticos bajo los que opera el sistema inmune normal.
- 10 De forma similar, después de un trasplante de médula ósea u otro trasplante de células madre hematopoyéticas de una fuente de tejido donante que contiene linfocitos maduros, los linfocitos transferidos reconocen los antígenos tisulares del huésped como extraños. Estas células se activan y montan un ataque hacia el huésped (una respuesta del injerto contra el huésped) que puede ser potencialmente mortal. Además, después de un trasplante de un órgano, los linfocitos del huésped reconocen los antígenos del tejido extraño del injerto del órgano y montan
- 15 respuestas repuestas inmunes celular y mediada por anticuerpos (una respuesta del huésped contra el injerto) que produce daño en el injerto y rechazo.
- Un resultado de una reacción autoinmune o de rechazo es la destrucción de tejido producida por células inflamatorias y los mediadores que liberan. Los agentes inflamatorios tales como los AINE actúan principalmente
- 20 bloqueando el efecto o secreción de estos mediadores pero no hacen nada para modificar la base inmunológica de la enfermedad. Por otra parte, los agentes citotóxicos, tal como la ciclofosfamida, actúan de tal manera no específica que se interrumpen tanto las respuestas normales como las autoinmunes. En efecto, los pacientes tratados con tales agentes inmunosupresores no específicos es tan probable que sucumban de la infección como de su enfermedad autoinmune.
- 25 Las composiciones de la presente invención son útiles en aplicaciones para las que triptolida y sus profármacos y otros derivados han demostrado eficacia, por ejemplo, en terapia de inmunosupresión, como en el tratamiento de enfermedad autoinmune, prevención del rechazo a trasplantes o tratamiento o prevención de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH). Véase, por ejemplo la patente en EE UU con cotitularidad No. 6.150.539. La triptolida y los derivados presentes también son útiles para el tratamiento de otras afecciones inflamatorias, tal como inflamación traumática, y en la reducción de la fertilidad masculina.
- 30 Las composiciones son útiles para inhibir el rechazo de un trasplante de órgano sólido, injerto de tejido o trasplante celular de un donante humano incompatible, prolongando de esta manera la supervivencia y la función del trasplante, y la supervivencia del receptor. Este uso incluiría, pero no estaría limitado a, trasplantes de órganos sólidos (tales como corazón, riñón e hígado), injertos de tejido (tales como piel, intestino, páncreas, gónadas, hueso y cartílago) y trasplantes celulares (tales como células del páncreas, cerebro y tejido nervioso, músculo, piel, hueso, cartílago e hígado).
- 35 Las composiciones también son útiles para inhibir el rechazo a xenotrasplantes (entre especies), es decir, en prevenir el rechazo de un trasplante de órgano sólido, injerto de tejido o trasplante celular de un animal no humano, sea de constitución natural o biomanipulado (genéticamente manipulado) para expresar genes, ARN, proteínas, péptidos humanos u otras molécula no nativas xenogénicas, o biomanipulados para perder expresión de los genes, ARN, proteínas, péptidos naturales del animal u otras moléculas normalmente expresadas. La invención también
- 40 incluye la utilidad de una composición como se describe anteriormente para prolongar la supervivencia de tal trasplante de órgano sólido, injerto de tejido o trasplante celular de un animal no humano.
- 45 También se incluyen métodos de utilidad de tratamiento de enfermedades autoinmunes o enfermedades que tienen manifestaciones autoinmunes, tales como la enfermedad de Addison, anemia hemolítica autoinmune, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes (tipo I), enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barre, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, esclerosis múltiple, miastenia grave, psoriasis, cirrosis biliar primaria, artritis reumatoide y uveítis, asma, aterosclerosis, tiroiditis de Hashimoto, encefalomiелitis alérgica, glomerulonefritis y varias alergias.
- 50 Las utilidades adicionales pueden incluir el tratamiento y profilaxis de enfermedades de la piel inflamatorias e hiperproliferativas y manifestaciones cutáneas de enfermedades inmunológicamente mediadas, tales como psoriasis, dermatitis atópica, pénfigo, urticaria, eosinofilia cutánea, acné y alopecia areata; varias enfermedades del ojo tales como conjuntivitis, uveítis, queratitis y sarcoidosis; inflamación de mucosas y vasos sanguíneos, tales como úlceras gástricas, daño vascular causado por enfermedades isquémicas y trombosis; enfermedades
- 55 isquémicas del intestino, enfermedades inflamatorias del intestino y enterocolitis necrotizante; inflamaciones/alergias intestinales tales como enfermedades celíacas y colitis ulcerosa; enfermedades renales tales como nefritis intersticial, síndrome de Goodpasture, síndrome urémico hemolítico y nefropatía diabética; enfermedades hematopoyéticas tales como púrpura trombocitopenia idiopática y anemia hemolítica autoinmune; enfermedades de la piel tales como dermatomiositis y linfoma de células T cutáneo; enfermedades circulatorias tales como arterioesclerosis y aterosclerosis; enfermedades renales tales como insuficiencia renal aguda isquémica e
- 60 insuficiencia renal crónica; y enfermedad de Behcet.
- 65

Las composiciones de la invención también son útiles para el tratamiento de afecciones inflamatorias tales como asma, tanto manifestaciones intrínsecas como extrínsecas, por ejemplo, asma bronquial, asma alérgica, asma intrínseca, asma extrínseca y asma al polvo, particularmente asma crónica o inveterada (por ejemplo, asma tardía e hiperreactividad de la vías respiratorias). La composición también se puede usar para el tratamiento de otras afecciones inflamatorias, incluyendo inflamación traumática, inflamación en la enfermedad de Lyme, bronquitis crónica (enfermedad pulmonar infecciosa crónica), sinusitis crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda asociado a septicemia y sarcoidosis pulmonar. Para el tratamiento de afecciones respiratorias tales como asma, la composición preferiblemente se administra mediante inhalación, pero cualquier vía convencional de administración puede ser útil.

Al tratar una afección autoinmune, al paciente se le da la composición de forma periódica, por ejemplo, 1-2 veces por semana, a un nivel de dosis suficiente para reducir los síntomas y mejorar el bienestar del paciente. Para tratar artritis reumatoide, en particular, la composición se puede administrar mediante inyección intravenosa o mediante inyección directa en la articulación afectada. El paciente puede ser tratado a intervalos repetidos de al menos 24 horas, durante un periodo de varias semanas después del inicio de los síntomas de la enfermedad en el paciente. La dosis que se administra preferiblemente está en el intervalo de 1-25 mg/kg de peso corporal del paciente por día, prefiriéndose cantidades menores para la administración parenteral, y prefiriéndose cantidades mayores para la administración oral. Las dosis óptimas se pueden determinar mediante experimentación rutinaria según métodos conocidos en la técnica.

Para terapia en el rechazo de trasplantes, la utilidad se pretende particularmente para el tratamiento de rechazo de trasplantes de corazón, riñón, hígado, celular y médula ósea, y también se puede usar en el tratamiento de EICH. El tratamiento típicamente se inicia perioperativamente, bien poco antes o poco después del procedimiento de trasplante quirúrgico, y continua en una pauta de dosificación diaria, durante un periodo de al menos varias semanas, para el tratamiento de rechazo de trasplante agudo. Durante el periodo de tratamiento, se puede ensayar periódicamente el nivel de inmunosupresión del paciente; por ejemplo, mediante una reacción de linfocitos mezcla que implica linfocitos alógenos o tomando una biopsia del tejido trasplantado.

Además, la composición se puede administrar crónicamente para prevenir rechazo a injertos, o en el tratamiento de episodios agudos de rechazo tardío de injertos. Como anteriormente, la dosis administrada es preferiblemente de 1-25 mg/kg de peso corporal del paciente por día, prefiriéndose cantidades menores para la administración parenteral y cantidades mayores para la administración oral. La dosis se puede aumentar o disminuir de forma apropiada, dependiendo de la respuesta del paciente, y durante el periodo de tratamiento, la capacidad del paciente de resistir infecciones.

En el tratamiento o prevención de la enfermedad del injerto contra el huésped, resultante del trasplante en un receptor de médula ósea, células del bazo, tejido fetal, sangre de cordón inmovilizado, o células madre movilizadas o recogidas de otra manera, coincidentes o no coincidentes, la dosis está preferiblemente en el intervalo de 0,25-2 mg/kg de peso corporal/día, preferiblemente de 0,5-1 mg/kg/día, dada por vía oral o parenteral.

También está dentro del ámbito de la invención una combinación para terapia que comprende un compuesto de fórmula I y uno o más agentes inmunosupresores convencionales. Estos agentes inmunosupresores dentro del ámbito de esta invención incluyen, pero no están limitados a, Imurek® (azatioprina sódica), brequinar sódico, Spanidin™ (triclorhidrato de gusperimus, también conocido como desoxispergualina), mizoribina (también conocido como bredinina), Cellcept® (micofenolato mofetilo), Neoral® (Ciclosporina A; también comercializada como una formulación diferente bajo el nombre comercial de Sandimmune®), Prograf™ (tacrolimus, también conocido como FK-506), Rapimmune® (sirolimus, también conocido como rapamicina), leflunomida (también conocido como HWA-486), Zenapax®, glucocorticoides, tales como prednisolona y sus derivados, anticuerpos tales como ortoclon (OKT3), y globulinas antitimocito, tales como timoglobulinas. Los compuestos son útiles como potenciadores cuando se administran junto con otro fármaco inmunosupresor para tratamientos inmunosupresores como se discute anteriormente. Por tanto, se puede administrar un fármaco inmunosupresor convencional, tales como los anteriores, en una cantidad sustancialmente menor (por ejemplo, del 20% al 50% de la dosis estándar) que cuando el compuesto se administra solo. De forma alternativa, se administran el compuesto de la invención y un fármaco inmunosupresor en cantidades tales que la inmunosupresión resultante es mayor que la que se esperaría u obtendría de la suma de los efectos obtenidos con el fármaco y el compuesto de la invención usados solos. Típicamente, el fármaco inmunosupresor y el potenciador se administran a intervalos regulares durante un periodo de tiempo de al menos 2 semanas.

Las composiciones de la invención también se pueden administrar en combinación con un fármaco (o fármacos) antiinflamatorio convencional, donde el fármaco o la cantidad del fármaco es, por si misma, ineficaz para inducir la supresión o inhibición apropiada de la inflamación.

Se puede evaluar la actividad inmunosupresora de compuestos *in vivo* mediante el uso de modelos animales establecidos conocidos en la técnica. Se pueden usar tales ensayos para evaluar la eficacia relativa de compuestos inmunosupresores y para estimar dosis apropiadas para el tratamiento inmunosupresor. Estos ensayos incluyen, por

ejemplo, un sistema modelo de rata bien caracterizado para aloinjertos, descrito por Ono y Lindsey (1969), en el que se une un corazón trasplantado a los grandes vasos abdominales de un animal receptor alógeno, y se determina la viabilidad del corazón trasplantado mediante la capacidad del corazón de latir en el animal receptor. Se describe un modelo de xenoinjerto, en el que los animales receptores son de diferentes especies, por Wang (1991) y Murase (1993). Un modelo para evaluar la eficacia contra la EICH implica la inyección de ratones F1 normales con células de bazo parenterales; los ratones desarrollan un síndrome de EICH caracterizado por esplenomegalia e inmunosupresión (Korngold, 1978; Gleichmann, 1984). Se preparan suspensiones de células únicas a partir de bazos individuales, y se establecen cultivos en micropocillos en presencia y ausencia de concanavalina A para evaluar el grado de sensibilidad mitogénica.

V. Tratamiento anticáncer

Como se muestra en las figuras 1-2, un compuesto de fórmula I, 19-metil triptolida (designado PG795) y un compuesto de fórmula II, 18-desoxi-19-deshidro-18-benzoiloxi-19-benzoil triptolida (designado PG796), fueron cada uno citotóxicos para células Jurkat (véase, el ejemplo 2) de una manera dependiente de la dosis. Por tanto, la invención incluye la utilidad de los compuestos de la invención como agentes citotóxicos, particularmente para tratar cánceres. Como se usa en el presente documento, "cáncer" se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasia o tumores malignos encontrados en mamíferos especialmente seres humanos, incluyendo, leucemias, sarcomas, carcinomas y melanoma.

El término "leucemia" se refiere ampliamente a enfermedades malignas progresivas de los órganos que forman la sangre y en general se caracterizan por una proliferación y desarrollo distorsionados de leucocitos y sus precursores en la sangre y la médula ósea. El término "sarcoma" en general se refiere a un tumor que está hecho de una sustancia como el tejido conjuntivo embrionario y en general está compuesta de células estrechamente empaquetadas embebidas en una sustancia fibrilar u homogénea. El término "melanoma" se toma para significar un tumor que surge del sistema melanocítico de la piel y otros órganos. El término "carcinoma" se refiere a una neoplasia maligna hecha de células epiteliales que tienden a infiltrar los tejidos circundantes y da lugar a metástasis.

Por ejemplo, se incluyen cánceres que implican células derivadas del tejido reproductor (tales como las células de Sertoli, células reproductoras, espermatogonias, espermátides o espermatoцитos en desarrollo o más maduros y células nodriza, células reproductoras y otras células del ovario), los sistemas linfoides o inmune (tal como la enfermedad de Hodgkin y linfomas no de Hodgkin), el sistema hematopoyético y epitelio (tal como la piel, incluyendo melanoma maligno y aparato digesto), órganos sólidos, el sistema nervioso, por ejemplo, glioma (véase, Y.X. Zhou *et al.*, 2002) y tejido musculoesquelético. Los compuestos se pueden usar para el tratamiento de varios tipos de células cancerosas, incluyendo, pero no limitado a, tumores cerebrales, incluyendo meduloblastoma, de cabeza y cuello, mama, colon, de pulmón microcítico, de pulmón de células grandes, tiroides, testículo, vejiga, próstata, hepático, riñón, pancreático, esofágico, estómago, ovario, cervical o linfomas. El tratamiento de los tumores de mama, colon, pulmón y próstata se contempla particularmente.

Las composiciones se pueden administrar a un paciente afectado con cáncer y/o leucemia por una vía convencional de administración, como se ha discutido anteriormente. El método es útil para frenar el crecimiento de tumores, prevenir el crecimiento de tumores, inducir regresión parcial de tumores e inducir la regresión completa de tumores, hasta el punto de desaparición completa. El método también es útil en la prevención de la extensión de metástasis derivadas de tumores sólidos.

Las composiciones de la invención se pueden administrar como la única terapia o con otros tratamiento de apoyo o terapéuticos no diseñados para tener efectos anticáncer en el sujeto. El método también incluye administrar las composiciones de la invención en combinación con uno o más fármacos anticáncer convencionales o agentes proteicos biológicos, donde la cantidad del/de los fármaco(s) o agente(s) es, por si misma, ineficaz para inducir la supresión apropiada de crecimiento del cáncer, en una cantidad eficaz para tener los efectos anticáncer deseados en el sujeto. Tales fármacos anticáncer incluyen actinomicina D, camptotecina, carboplatino, cisplatino, ciclofosfamida, citosina arabinósido, daunorubicina, doxorubicina, etopósido, fludarabina, 5-fluorouracilo, hidroxiurea, gemcitabina, irinotecano, metotrexato, mitomicina C, mitoxantrona, paclitaxel, taxotere, tenipósido, topotecano, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina. Los agentes proteicos biológicos anticáncer incluyen factor de necrosis tumoral (TNF), ligando que induce apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), otros ligando y factores relacionados con TNF o relacionados con TRAIL, interferón, interleuquina-2, otras interleuquinas, otras citoquinas, quimioquinas, y factores, anticuerpos hacia moléculas o receptores relacionados con tumores (tal como anticuerpo anti-HER2) y agentes que reaccionan con o se unen a estos agentes (tales como miembros de la superfamilia de receptores de TNF, otros receptores, antagonistas de receptores y anticuerpos con especificidad para estos agentes).

Se puede evaluar la actividad antitumoral *in vivo* de una composición particular mediante el uso de modelos animales establecidos, como se describe, por ejemplo, en Fidler *et al.*, patente en EE UU No. 6.620.843. La dosis y pautas clínicas se determinan según métodos que conocen los médicos, basándose en factores tales como la gravedad de la enfermedad y estado global del paciente.

VI. Otras indicaciones

Los compuestos de la presente invención también se pueden usar en el tratamiento de ciertas enfermedades del SNC. El glutamato cumple numerosas funciones fisiológicas, incluyendo un papel importante en la patofisiología de varias enfermedades neurológicas y psiquiátricas. Se han implicado la excitotoxicidad y neurotoxicidad del glutamato en hipoxia, isquemia y trauma, así como en enfermedades neurodegenerativas o neurometabólicas crónicas, demencia de Alzheimer, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson. En vista de los efectos neuroprotectores descritos de la triptolida, particularmente protección de muerte celular inducida por glutamato (Q. He *et al.*, 2003; X. Wang *et al.*, 2003), se prevé que los compuestos de la invención antagonicen la acción neurotóxica de glutamatos y por tanto, puede ser una terapia nueva para tales enfermedades.

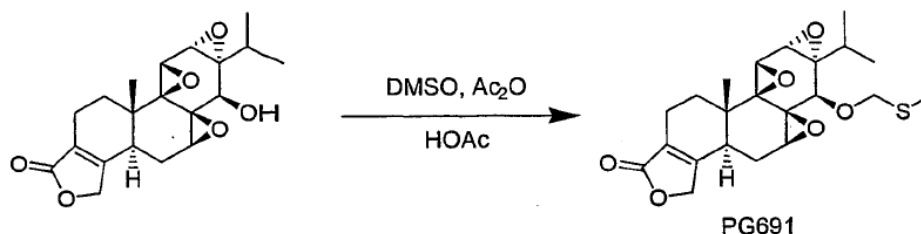
Evidencias recientes de pacientes de EM en recaída sugieren una homeostasia de glutamato alterada en el cerebro. Los sucesos neurotóxicos que se producen en pacientes de EM pueden ser responsables de la muerte celular de oligodendrocitos y neuronas. La excitotoxicidad mediada por receptor de glutamato antagonizante mediante el tratamiento con compuestos de esta invención puede tener implicaciones terapéuticas en pacientes de EM. Otras enfermedades del SNC tales como el síndrome de Guillain-Barre, la enfermedad de Meniere, polineuritis, neuritis múltiple, mononeuritis y radiculopatía también se pueden tratar con los compuestos de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención también se pueden usar en el tratamiento de ciertas enfermedades pulmonares. La fibrosis pulmonar (FP) idiopática es una enfermedad pulmonar intersticial progresiva de etiología desconocida. La FP se caracteriza por el depósito excesivo de matriz intracelular y colágeno en el intersticio del pulmón y la sustitución gradual de los alveolos por tejido cicatricial como resultado de la inflamación y fibrosis. Según progresa la enfermedad, el aumento en tejido cicatricial interfiere con la capacidad de transferir oxígeno de los pulmones al torrente sanguíneo. Se ha descrito que un éster 14-succinimida de triptolida bloquea la FP inducida por bleomicina (G. Krishna *et al.*, 2001). Según esto, los compuestos de la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento de FP. También se considera el tratamiento de otras enfermedades respiratorias, tales como sarcoidosis, pulmón fibroso y neumonía intersticial idiopática.

Otras enfermedades que implican al pulmón y que se prevé que sean tratables por compuestos de esta invención incluyen el síndrome respiratorio agudo grave (SRAG) y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). En particular, con respecto al SRAG, la reducción del contenido del virus (SRAG-CoV) antes del pico del proceso de la enfermedad y la utilidad del tratamiento con corticosteroides, como se indica posteriormente, sugieren que el desarrollo de los efectos más graves potencialmente mortales de SRAG pueden resultar de la respuesta exagerada del cuerpo a la infección (hiperactividad inmune) más que de efectos del virus mismo. (Véase también la solicitud provisional en EE UU en tramitación junto esta y con cotitularidad S.N. 60/483.335. El tratamiento con corticosteroides se ha usado en pacientes de SRAG para suprimir la liberación masiva de citoquinas que pueden caracterizar la fase hiperactiva inmune, con la esperanza que parará la progresión de la enfermedad pulmonar en la siguiente fase. El tratamiento con corticosteroides ha producido buenos resultados clínicos en la reducción de algunos de los síntomas principales del SRAG. Sin embargo, hay varios efectos secundarios relacionados con el tratamiento, y hay una necesidad clara para agentes inmunosupresores y/o antiinflamatorios más selectivos.

Ejemplos

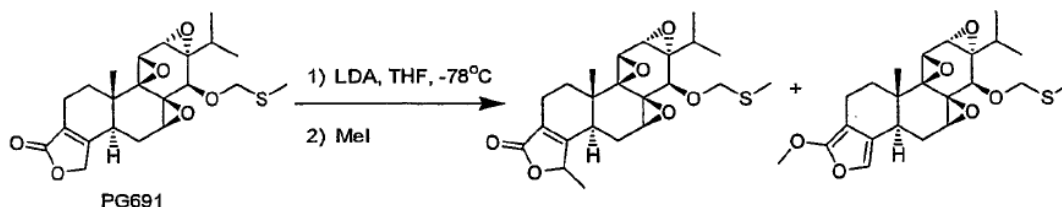
Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren pero no limiten en modo alguno la invención.

Ejemplo 1. Preparación de 19-metil triptolida (PG795)A. Protección del grupo 14-hidroxilo

A una solución de triptolida (designada PG490) (0,56 g, 1,6 mmoles) en DMSO (8,5 ml, 0,12 moles) se añadió ácido acético (28 ml, 0,49 moles) y anhídrido acético (5,6 ml, 59 moles). La solución incolora transparente se agitó a temperatura ambiente durante cinco días. La mezcla de reacción se echó en 200 ml de agua y se neutralizó con bicarbonato de sodio sólido, añadido en porciones. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 150 ml) y el extracto se secó sobre sulfato de sodio anhídrido. La concentración a presión reducida dio el producto crudo como un aceite. La purificación por cromatografía en columna de gel de sílice (hexanos/acetato de etilo 3:2) dio el derivado 14-(metiltio)metoxi (designado PG691) (0,45 g, 69%) como una espuma blanca. ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,83 (d, J = 6,8

Hz, 3H), 1,01 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 1,10 (s, 3H), 1,20 (m, 1H), 1,61 (m, 1H), 1,92 (dd, $J = 14,7, 13,4$ Hz, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,10-2,42 (m, 4H), 2,70 (m, 1H), 3,24 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H), 3,51 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H), 3,68 (s, 1H), 3,79 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H), 4,68 (m, 2H), 4,95 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H), 5,09 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H).

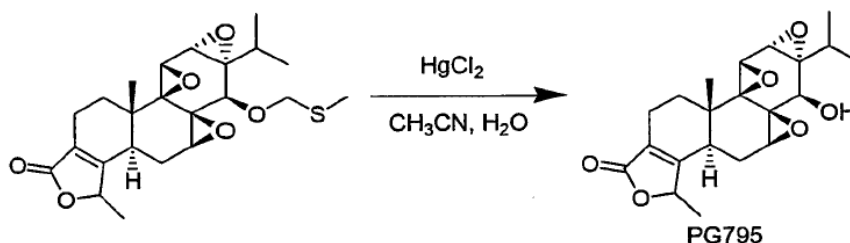
5 B. Metilación



10 A una solución de PG691 (0,22 g, 0,52 mmoles) en THF anhídrido (10 ml) se añadió una solución de LDA en heptano/THF/etilbenceno (0,30 ml de solución 2,0 M, 0,60 mmoles) gota a gota a -78°C . La solución resultante se agitó a esta temperatura durante 15 minutos, seguido por la adición gota a gota de yoduro de metilo (50 μl , 0,80 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a -78°C durante 2 horas, después se dejó llegar a temperatura ambiente durante la noche.

15 La mezcla de reacción se neutralizó con HCl 1N, y la solución bifásica se extrajo con EtOAc (10 ml x 3). La solución de EtOAc se lavó con tiosulfato de sodio acuoso al 5% (10 ml x 2) y se secó sobre sulfato de sodio anhídrido. La concentración a presión reducida dio un aceite. La purificación en columna (gel de sílice, hexanos/acetato de etilo 3:2) dio dos productos, 19-metiltriptolida protegida con metiltiomemilo (45,9 mg, 20%), ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,84 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H), 1,03 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H), 1,10 (s, 3H), 1,16 (m, 1H), 1,44 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 1,59 (m, 1H), 1,92 (t, $J = 14,0$ Hz, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,10-2,42 (m, 4H), 2,62 (m, 1H), 3,25 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H), 3,31 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H), 3,69 (s, 1H), 3,79 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H), 4,89 (m, 1H), 4,95 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H), 5,09 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H), y 18-metoxifuranotriptolida protegida con metiltiomemilo (33,1 mg, 15%), ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,84 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H), 1,01 (s, 3H), 1,02 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H), 1,30 (s, 3H), 1,37 (m, 2H), 1,69 (m, 2H), 1,95 (dd, $J = 15,0, 12,6$ Hz, 1H), 2,10 (m, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,27-2,47 (m, 2H), 3,19 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), 3,54 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H), 3,67 (s, 1H), 3,93 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H), 4,94 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H), 5,08 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H), 6,44 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H).

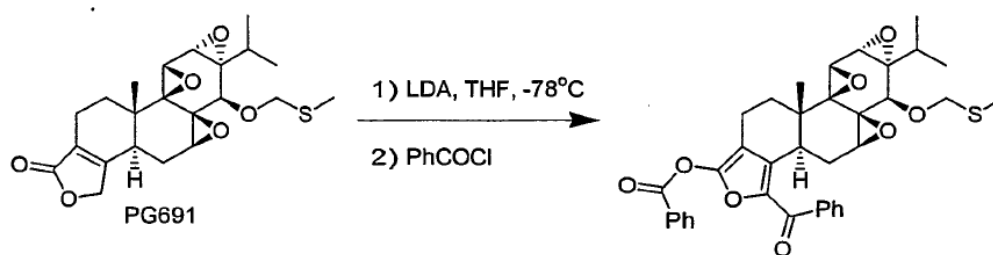
25 C. Desprotección



30 A una solución de 19-metiltriptolida protegida con metiltiomemilo, preparada como se describe anteriormente (45,9 mg, 0,106 mmoles), en 1,5 ml de acetonitrilo/agua (4:1) se añadió cloruro mercúrico (0,285 g, 1,05 mmoles) en una porción. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El sólido blanco que precipitó de la solución se eliminó mediante filtración a través de Celite® y se enjuagó con acetato de etilo. La solución de EtOAc se lavó dos veces con NH_4OAc acuoso al 5%. La fase orgánica se secó (Na_2SO_4) y se concentró a presión reducida para dar el producto crudo. La purificación por cromatografía en columna (gel de sílice, hexanos/acetato de etilo 1:1) dio el producto puro (39,5 mg, 99%). ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,88 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 1,01 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 1,11 (s, 3H), 1,16 (dt, $J = 11,5, 2,0$ Hz, 1H), 1,43 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H), 1,54 (ddd, $J = 12,4, 6,4, 1,3$ Hz, 1H), 1,92 (dd, $J = 14,9, 13,4$ Hz, 1H), 2,10-2,36 (m, 4H), 2,62 (m, 1H), 2,74 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H), 3,38 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H), 3,42 (d, $J = 10,8$ Hz, 1H), 3,53 (dd, $J = 3,1, 0,9$ Hz, 1H), 3,90 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H), 4,88 (m, 1H); IR (CH_2Cl_2) 1754, 1047 cm^{-1} .

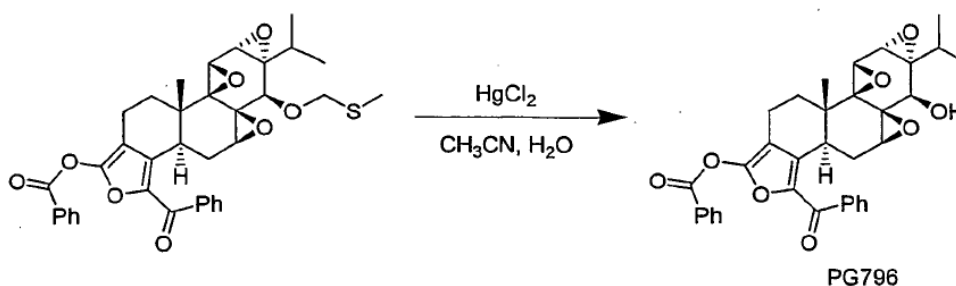
Ejemplo 2. Preparación de 18-desoxo-19-deshidro-18-benzoiloxi-19-benzoil triptolida (PG796)

45 A. Acilación



A una solución de PG691, preparado como se describe anteriormente (73,1 mg, 0,174 mmoles), en THF anhídrido (5 ml) se añadió una solución de LDA en heptano/THF/etilbenceno (0,17 ml de solución 2,0 M, 0,34 mmoles) gota a gota a -78°C. La solución restante se agitó a esta temperatura durante 15 minutos, seguido por la adición gota a gota de cloruro de benzoilo puro (100 µl, 0,86 mmoles). La reacción se agitó a -78°C durante 2 horas. La reacción se extinguió con agua y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (25 ml x 3). La solución orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhídrido. La concentración a presión reducida dio un aceite. La purificación en columna (gel de sílice, hexanos/acetato de etilo 3:2) dio el producto 14-protegido (51,2 mg, 47%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,78 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 0,91 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,13 (s, 3H), 1,17 (m, 1H), 1,58 (m, 1H), 1,86 (m, 1H), 2,13 (s, 3H), 2,17-2,39 (m, 3H), 2,45 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 2,58-2,76 (m, 2H), 3,21 (s, 1H), 3,39 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 3,70 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 4,85 (d, *J* = 11,87 Hz, 1H), 4,95 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H), 7,34-7,48 (m, 3H), 7,56-7,65 (m, 2H), 7,65-7,71 (m, 1H), 7,71-7,78 (m, 2H), 8,21-8,29 (m, 2H).

B. Desprotección



A una solución del producto 14-metilmetilo protegido, preparado como se describe anteriormente (51,2 mg, 0,0814 mmoles), en 1,5 ml de acetonitrilo/agua (4:1) se añadió cloruro mercúrico (0,22 g, 0,81 mmoles) en una porción. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El sólido blanco que precipitó de la solución se eliminó mediante filtración a través de Celite® y se enjuagó con acetato de etilo. La solución de EtOAc se lavó dos veces con NH₄OAc acuoso al 5%. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró a presión reducida para dar el producto crudo. La purificación por cromatografía en columna proporcionó el producto puro (32,8 mg, 71%). ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,82 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H), 0,92 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H), 1,15 (s, 3H), 1,17 (m, 1H), 1,54 (m, 1H), 1,88 (m, 1H), 2,18 (septeto, *J* = 6,9 Hz), 2,30-2,40 (m, 2H), 2,53 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H), 2,56 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 2,61 (m, 1H), 2,72 (ddd, *J* = 15,0, 6,4, 4,2 Hz, 2H), 2,98 (d, *J* = 10,2 Hz, 1H), 3,40 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 3,81 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 7,35-7,47 (m, 3H), 7,54-7,63 (m, 2H), 7,63-7,71 (m, 1H), 7,71-7,78 (m, 2H), 8,21-8,28 (m, 2H); IR (CH₂Cl₂) 1768, 1751, 1236, 1123 cm⁻¹.

Ejemplo 3. Ensayo de citotoxicidad (MTT)

Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO a una concentración de 20 mM. Se hicieron diluciones adicionales en medio RPMI1640 (GIBCO, Rockville, MD) suplementado con suero fetal de ternera al 10% (HyClone Laboratories, Logan, UT).

Se determinó la citotoxicidad de los compuestos en un ensayo MTT estándar usando el kit de proliferación celular I (#1 465 007, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Brevemente, se cultivaron células de linfoma de células T humanas (Jurkat) (4 x 10⁵ por pocillo) durante 24 horas, en placas de cultivo de 96 pocillos, en presencia de diluciones en serie de tres veces de los compuestos de prueba o medio que contenía la misma concentración de DMSO que en las muestras de prueba en cada punto de dilución. Los cultivos se suplementaron después con reactivo MTT 10 µl/pocillo durante 4 horas y después con reactivo de solubilización 0,1 ml/pocillo durante 16 horas adicionales. Se midió la densidad óptica a 570 nm (DO₅₇₀) en un lector de microplacas ThermoScan (Molecular Devices, Menlo Park, CA).

Los datos se presentan como valores de DO₅₇₀ frente a la concentración de los compuestos. Los resultados para 19-metil triptolida (PG975), comparados con triptolida (PG490) y un control de medio, se dan en la figura 1. Los resultados para PG796, comparados con triptolida 14-succinato (PG490-88) y un control de medio se dan en la

figura 2. En este caso, los datos se proporcionan para ambos compuestos incubados en suero humano y suero de ratón, y para PG796 sin incubación.

Ejemplo 4. Ensayo de producción de IL-2

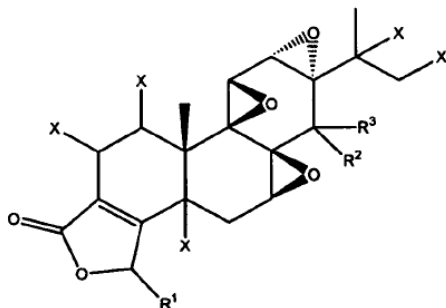
5 Las muestras de prueba se diluyeron a 1 mM en medio de cultivo completo. Se colocaron las alícuotas en placas de microcultivo que se habían recubierto con anticuerpo anti-CD3 (usado para estimular la producción de IL-2 por
10 células Jurkat) y se prepararon diluciones en serie de modo que la concentración final abarcara el intervalo de 0,001 a 10.000 nM en incrementos logarítmicos. Se recogieron células de un cultivo en expansión exponencial de la línea
15 de células T humanas Jurkat (#TIB-152, obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA), se lavaron una vez mediante centrifugación, se resuspendieron en medio de cultivo completo y se diluyeron a una concentración de 2×10^6 células/ml. Se añadió un volumen de 50 μ l de células Jurkat (1×10^5 células) a pocillos que
20 contenían 100 μ l de los compuestos diluidos, se añadieron a cada pocillo 50 μ l de PMA (10 ng/ml) y las placas se incubaron a 37°C en un incubador de CO₂ al 5%. Después de 24 horas, las placas se centrifugaron para precipitar
25 las células, se retiraron 150 μ l de sobrenadante de cada pocillo y las muestras se almacenaron a -20°C. Se analizó la concentración de IL-2 en los sobrenadantes almacenados usando Luminex 100 (Luminex Corporation, Austin, TX), microesferas de Luminex acopladas con un anticuerpo de captura anti-IL-2, y anticuerpo de detección anti-IL-2 acoplado a fluorocromo. Los datos se expresaron como pg/ml de IL-2.

20 Los datos se representaron como la concentración de compuesto frente a la concentración de IL-2. Los resultados para 19-metil triptolida (PG975), comparados con triptolida (PG490) y un control de medio, se dan en la figura 3. Los resultados para PG796, comparados con triptolida 14-succinato (PG490-88) y un control de medio se dan en la
25 figura 4. En este caso, los datos se proporcionan para ambos compuestos incubados en suero humano y suero de ratón, y para PG796 sin incubación.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura I:

5



I

donde

10

R^1 es alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, arilo, arilacilo o $C(OH)R^4R^5$,

Donde arilacilo es $-C(O)R$ y R es arilo;

en donde R^4 y R^5 son independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, alqueno o cicloalqueno, cualquiera de los cuales, excepto hidrógeno, puede estar sustituido con alcoxi, hidroxi, aciloxi o arilo; en donde cada uno de dichos alquilo, alqueno, alquino, alcoxi y aciloxi incluye como máximo cuatro átomos de carbono, cada uno de dichos cicloalquilo y cicloalqueno incluye como máximo seis átomos de carbono, y

15

cada uno de dichos arilo es monocíclico y no heterocíclico;

CR^2R^3 es $CHOH$ o $C=O$, y

como máximo uno de los grupos X es hidroxilo, y los restantes grupos X son hidrógeno.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde CR^2R^3 es $CHOH$.

20

3. El compuesto de la reivindicación 2, en donde CR^2R^3 es $CHOH$ (β -hidroxi).

4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde cada X es hidrógeno.

25

5. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R^1 es alquilo, alqueno o $C(OH)R^4R^5$.

6. El compuesto de la reivindicación 5, en donde R^4 y R^5 son independientemente hidrógeno, alquilo o alqueno.

30

7. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R^1 es alquilo o hidroxialquilo.

8. El compuesto de la reivindicación 7, en donde R^1 es alquilo o hidroxialquilo de C_1-C_3 .

9. El compuesto de la reivindicación 8, en donde R^1 es metilo.

35

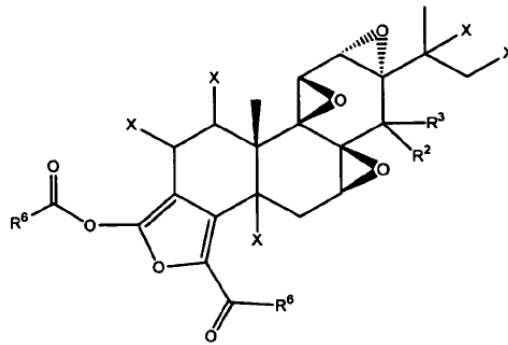
10. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R^1 es arilacilo como se ha definido anteriormente.

11. El compuesto de la reivindicación 10, en donde R^1 es benzoilo ($C(O)C_6H_5$).

40

12. El compuesto de la reivindicación 4, en donde R^1 es benzoilo.

13. Un compuesto que tiene la estructura II:



II

donde

cada R^6 se selecciona independientemente de alquilo, alqueniilo, alquinilo o arilo, en donde cada uno de dichos alquilo, alqueniilo y alquinilo incluye como máximo cuatro átomos de carbono y cada uno de dichos arilo es monocíclico y no heterocíclico;

CR^2R^3 es CHOH o C=O;

como máximo uno de los grupos X es hidroxilo, y los restantes grupos X son hidrógeno.

- 5
14. El compuesto de la reivindicación 13, en donde CR^2R^3 es CHOH.
- 10
15. El compuesto de la reivindicación 14, en donde CR^2R^3 es CHOH (β -hidroxi).
16. El compuesto de la reivindicación 13, en donde cada X es hidrógeno.
- 15
17. El compuesto de la reivindicación 13, en donde cada R^6 es arilo como se ha definido anteriormente.
18. El compuesto de la reivindicación 17, en donde cada R^6 es fenilo.
- 20
19. Un método de inducir apoptosis en una célula diferente de un tratamiento terapéutico, que comprende poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
20. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para su uso en realizar inmunosupresión en un sujeto.
- 25
21. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para su uso en inducir apoptosis en una célula.

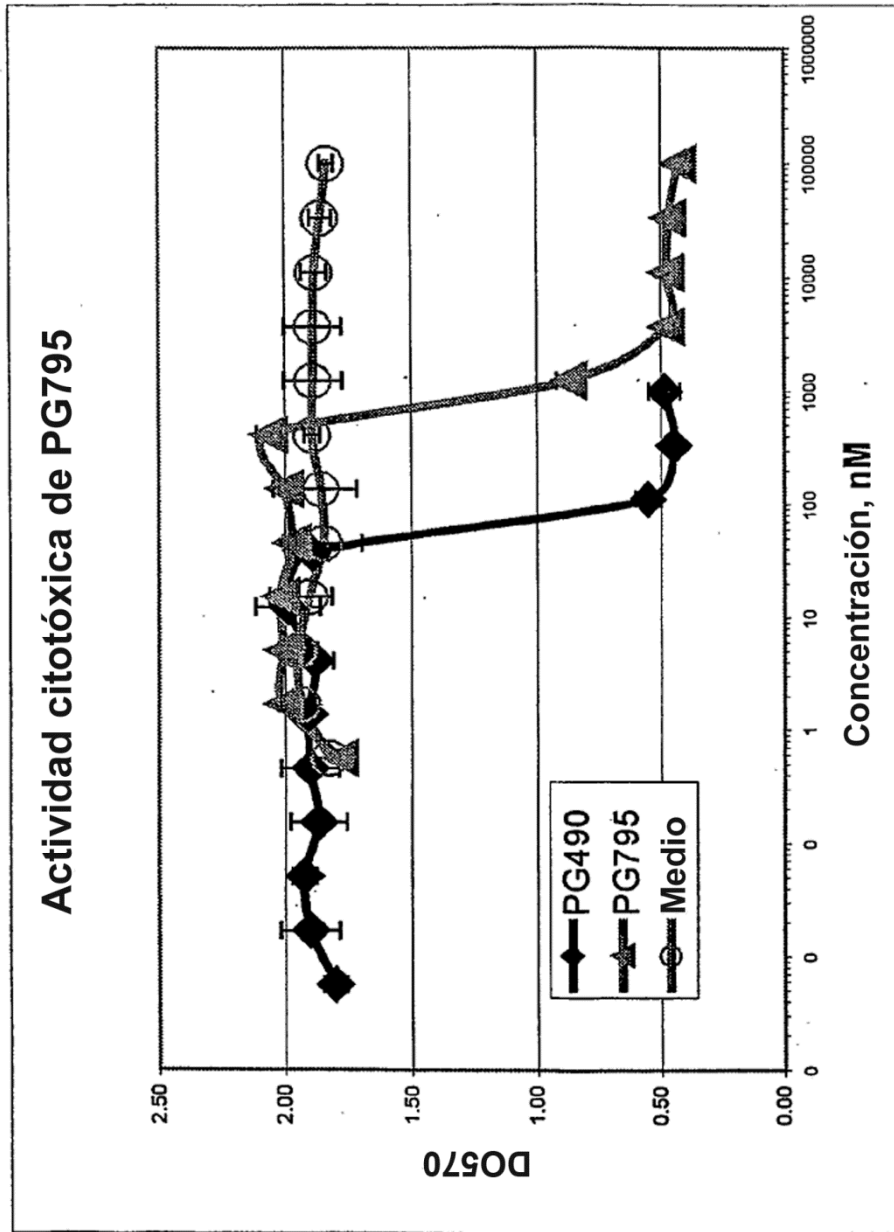


Fig. 1

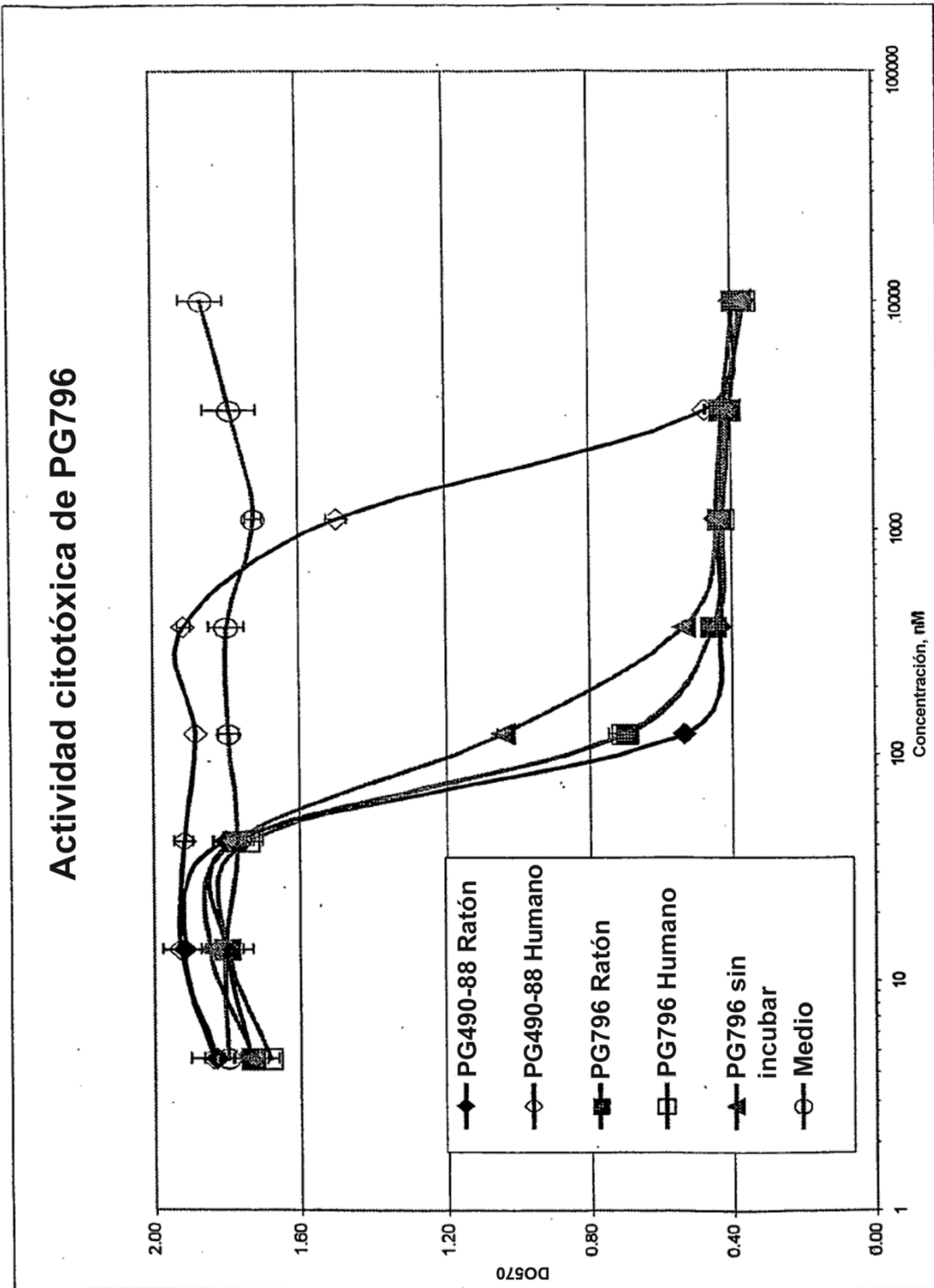


Fig. 2

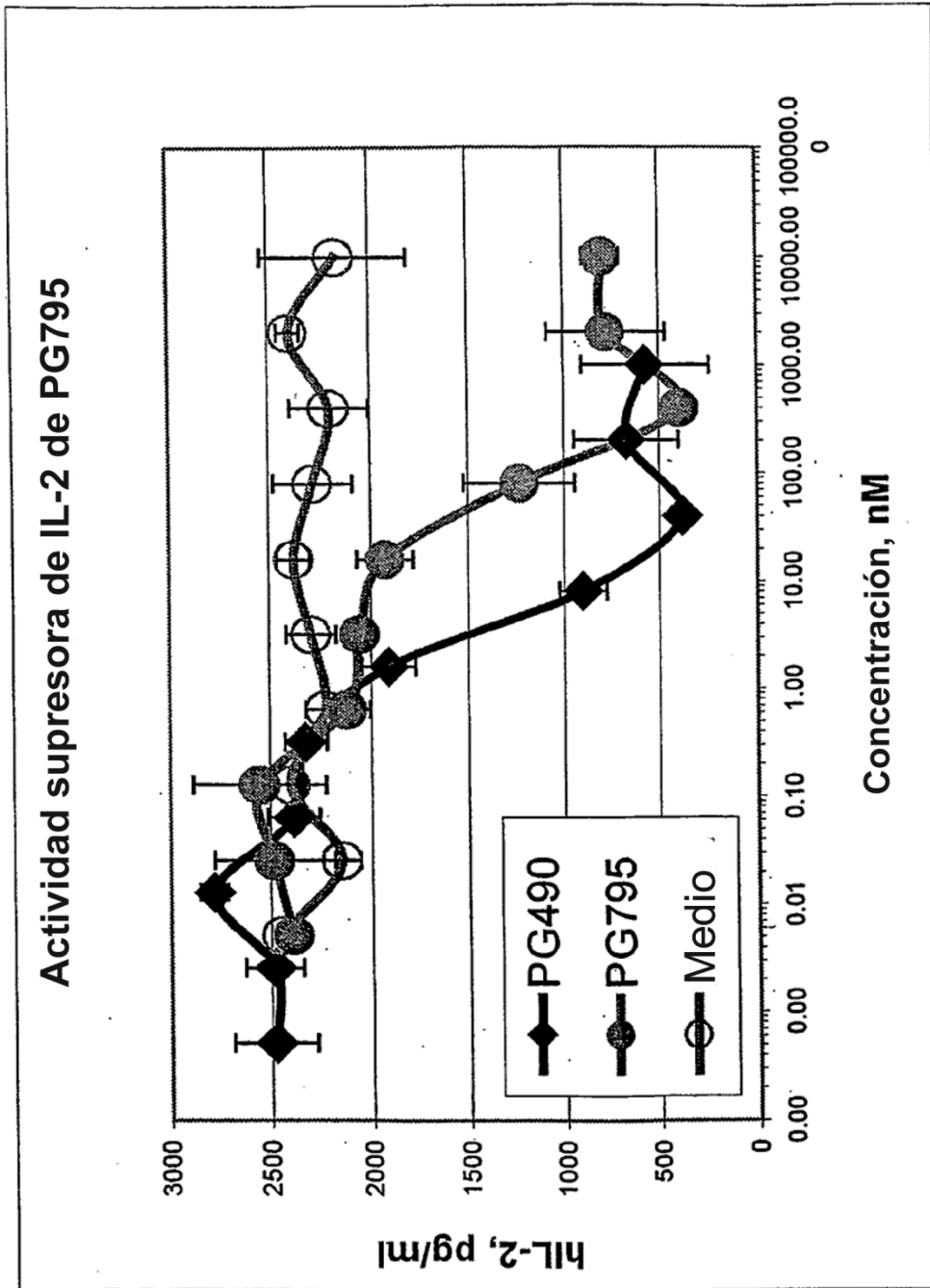


Fig. 3

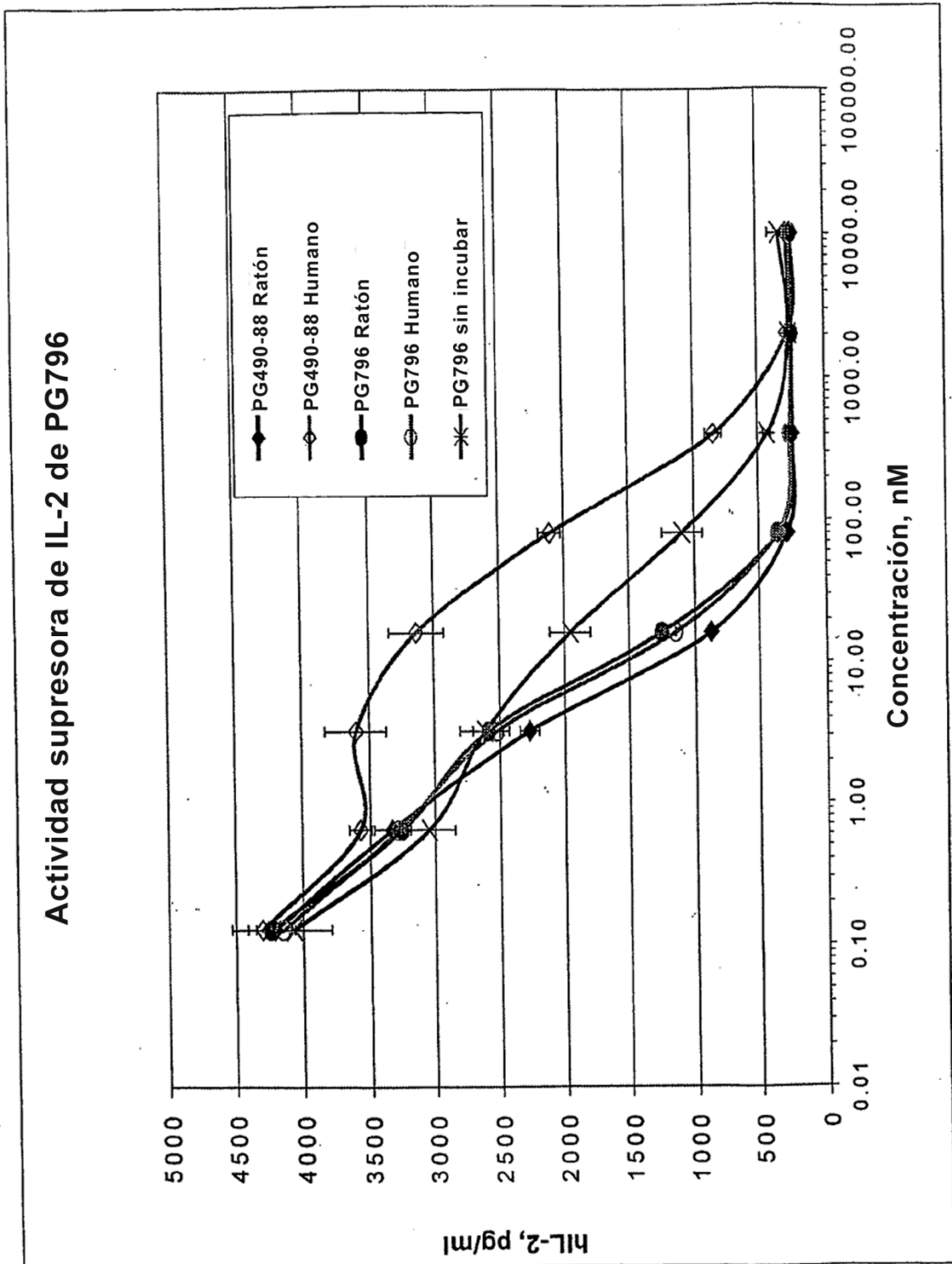


Fig. 4