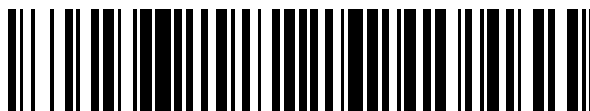


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 003**

51 Int. Cl.:

A61K 31/765 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
C08G 61/12 (2006.01)
C08G 73/06 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2006 E 06777076 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 1919979**

54 Título: **Conjugados poliméricos de K-252a y sus derivados.**

30 Prioridad:

25.08.2005 US 710890 P
27.09.2005 US 720454 P
07.06.2006 US 811469 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2014

73 Titular/es:

CREABILIS THERAPEUTICS S.P.A. (100.0%)
BIOINDUSTRY PARK, VIA RIBES, 5
10010 COLLERETTO GIACOSA, IT

72 Inventor/es:

TRAVERSA, SILVIO;
BAGNOD, RAFFAELLA;
BARONE, DOMENICO;
BERTARIONE RAVA ROSSA, LUISA;
FUMERO, SILVANO;
MAINERO, VALENTINA;
MARCONI, ALESSANDRA;
ODERDA, CECILIA;
PINCELLI, CARLO;
LORENZETTO, CHIARA y
BECCARIA, LUCA

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 444 003 T3

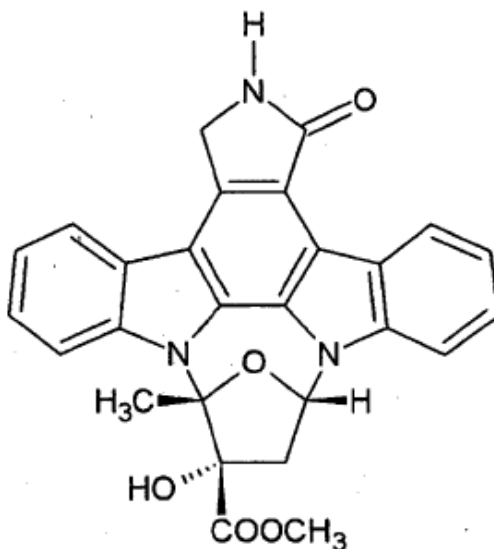
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Conjugados poliméricos de K-252a y sus derivados.

- 5 La presente invención se refiere a novedosos conjugados poliméricos de K-252a y sus derivados y a su uso para la preparación de una composición farmacéutica útil para la prevención, alivio y tratamiento de las patologías asociadas a quinasas. En particular, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I) para su uso en la prevención, alivio y tratamiento de patologías asociadas a HMGB1. En un aspecto concreto, la invención se refiere al uso de novedosos conjugados poliméricos de K-252a y sus derivados en la preparación de una composición farmacéutica útil para la prevención, el alivio y el tratamiento de trastornos neurológicos, neuropatías y trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso central y periférico. En un aspecto preferido adicional, la invención se refiere al uso de los conjugados poliméricos en la preparación de una composición farmacéutica útil para la prevención, el alivio y el tratamiento de patologías cutáneas, en particular patologías cutáneas asociadas con una excesiva proliferación de queratinocitos, en particular, psoriasis. En un aspecto más adicional, la invención se refiere a los conjugados poliméricos para su uso en la prevención, el alivio y el tratamiento del dolor relacionado con NGF. De forma más específica, la presente invención se refiere a un conjugado polimérico de K-252a y sus derivados, donde el polímero es polietilenglicol o metoxipolietilenglicol.

- 20 K-252a es un alcaloide lipofílico aislado por primera vez del hongo del suelo *Nocardopsis* sp (documento WO 97/38120), que tiene un esqueleto de indolocarbazol representado por la siguiente fórmula:



- 25 K-252a inhibe fuertemente la proteína quinasa C (PKC), que juega un papel central en la regulación de las funciones celulares, y tiene diversas actividades tales como la acción de inhibir la contracción del músculo liso (Jpn. 3. Pharmacol. 43 (supl.): 284, 1987), la acción de inhibir la excreción de serotonina (Yamada y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 144: 35-40, 1987), la acción de inhibir el alargamiento de los axones de neuronas (Koizumi y col., J. Neurosci. Res. 8: 715, 1988), la acción de inhibir la liberación de histamina (Morita y col., Allergy 43: 100-104, 1988), la acción de inhibir la quinasa de cadena ligera de la miosina del músculo liso (Nakanishi y col., J. Biol. Chem. 263: 6215-6219, 1988), acción antiinflamatoria (Papp y col., Acta Physiol. Hung. 80: 423-425, 1992), la actividad de supervivencia celular (Glicksman y col., J. Neurochem. 64: 1502-1512, 1995), etc. Se ha descrito también en Grove y col., Exp. Cell Res., 193: 175-182, 1991 que K-252a tiene la actividad de inhibir la producción de IL-2. Se ha conseguido también la síntesis completa de K-252a (Wood y col., J. Am. Chem. Soc. 117: 10413-10414, 1995).
- 35 El factor de crecimiento nervioso (NGF) es la neurotrofina mejor caracterizada y se requiere para el desarrollo y función normales de determinadas neuronas sensoriales y colinérgicas (Levi-Montalcini, Annu. Rev. Neurosci. 5: 341-362, 1982). Los receptores neurotróficos de alta afinidad, los trk, comprenden una familia de proteínas que consiste en trk A, trk B, y trk C (Knusel y col., J. Neurochem. 59: 715-722, 1992). Los miembros de esta familia de receptores son proteínas asociadas a membrana que presentan actividad tirosina quinasa. La interacción de un ligando de la neurotrofina con trks induce la fosforilación de restos tirosina específicos en el receptor. La fosforilación de los trk es una respuesta inmediata a la unión de la neurotrofina. Es un requisito absoluto para la activación de las rutas enzimáticas que regulan las respuestas funcionales de la célula a las neurotrofinas (Klein y col., Cell 65: 189-197, 1991; Lamballe y col., Cell 66: 967-979, 1991). K-252a es un inhibidor de varias enzimas, que incluyen los trk. Consistente con este efecto, K-252a bloquea la supervivencia celular mediada por NGF en algunos ensayos celulares in vitro (Koizumi y col., J. Neurosci. 8: 715-721, 1988; Doherty y col., Neurosci. Lett. 96: 1-6, 1989; Matsuda y col., Neurosci. Lett. 87: 11-17, 1988), ya que afecta al estado de fosforilación de los trk.

En la bibliografía se muestra el potencial terapéutico de K-252a y sus derivados, como por ejemplo, el análogo de bis-etil-tiometilo CEP-1347, en enfermedades neurodegenerativas (Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2004; 44: 451-74; Neurochem Int. Nov-Dic de 2001; 39(5-6): 459-68; Neuroport. 2000 Nov 9; 11 (16): 3453-6; Neuroscience. 1998 Sep; 86(2): 461-72; Brains Res. 1994 Jul 4; 650(1): 170-4).

Los queratinocitos, un componente celular clave para la homeostasia y los procesos patofisiológicos de la piel, secretan numerosas citoquinas y son estimulados por diversos factores de crecimiento. NGF se sintetiza en la piel y estimula de forma significativa la proliferación de queratinocitos humanos normales en un cultivo de una manera dependiente de la dosis. Este efecto puede evitarse mediante la adición de K-252a, que es un inhibidor específico del receptor de NGF de alta afinidad (trk), sugiriendo de esta manera que el efecto de NGF sobre los queratinocitos humanos está mediado por el receptor NGF de alta afinidad. De esta manera, NGF podría actuar como una citoquina en la piel humana y tomar parte en trastornos de proliferación de los queratinocitos (Pincelli y col., J. Invest. Dermatol. 103:13-18, 1994). Se han estudiado de forma extensa la inflamación neurogénica y el papel de NGF en la psoriasis. Existen niveles crecientes de NGF en los queratinocitos y regulación en exceso del receptor de NGF en los nervios cutáneos de las placas psoriáticas. NGF puede afectar a todos los episodios patológicos emergentes notificados en la psoriasis, tales como la proliferación de queratinocitos, la angiogénesis, la activación de los linfocitos T, la expresión de la molécula de adhesión, la proliferación de nervios cutáneos, y la regulación en exceso de neuropéptidos. En un estudio controlado por placebo en doble ciego, el papel de NGF y del receptor de NGF en la psoriasis se abordó en un sistema in vivo utilizando el modelo de piel de ratón-humano inmunodeficiente combinado grave (SCID) de la psoriasis. Las placas psoriáticas trasplantadas en los ratones SCID se trataron con K-252a. La psoriasis mejoró significativamente tras 2 semanas de tratamiento. (Raychaudhuri y col., J. Invest. Dermatol. 122:812-819, 2004).

Se ha notificado además que NGF tiene un papel crucial en la generación de dolor e hiperalgesia en algunos estados de dolor agudo y crónico. La expresión de NGF es elevada en tejidos lesionados e inflamados, y la activación del receptor de NGF de la tirosina quinasa TrkA en neuronas nociceptivas estimula y potencia la señalización del dolor mediante múltiples mecanismos. Se espera que el antagonismo de NGF sea una solución terapéutica muy eficaz en muchas patologías dolorosas, y que esté exenta de los efectos adversos de los tradicionales fármacos analgésicos [Hefti FF y col. Trends Pharmacol. Sci. (2006) 27:85-91]. La evidencia indica que se requieren los receptores TrkA para las acciones nociceptivas de NGF. La mayoría de los inhibidores de los receptores de la tirosina quinasa bloquean la unión del ATP al dominio catalítico de la tirosina quinasa [Madhusudan S y col. Clin. Biochem. (2004) 37: 618-635]. El alcaloide K-252a inhibe la señalización de Trk fuertemente y atenúa la hipersensibilidad en un modelo animal de dolor de páncreas [Winston JH y col. J. Pain (2003) 4: 329-337]. Sin embargo, K-252a carece de selectividad para TrkA debido a que es un potente inhibidor de algunas quinasas. Esto significa que es probable que K-252a tenga muchos efectos adversos que no están relacionados con la inhibición de TrkA.

La solicitud de patente WO 2005/014003 describe el uso de inhibidores de la tirosina quinasa de origen microbiano que pertenecen a la familia de K-252, para preparar medicamentos tópicos capaces de inhibir la proliferación excesiva de queratinocitos característica de trastornos tales como la psoriasis y tumores de la piel.

B.H. Long y B.N. Balasubramanian (Non-camptothecin topoisomerase I active compounds as potential anticancer agents, Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2000, Reino Unido; Vol. 10, nº. 5, páginas 635-666) describen que se pueden usar indocarbazoles como estabilizantes intermedios de la topoisomerasa I en la quimioterapia contra el cáncer. Se describe, entre otros, el compuesto k-252a.

La solicitud de patente Europea EP 0 303 697 A1 describe novedosos derivados de K252, entre ellos K-252a. Los compuestos activos son sustancias fisiológicamente activas que tienen actividad inhibidora de la proteína quinasa C y actividad oncostática.

La solicitud de patente internacional PCT/EP2005/008258 describe el uso de K-252a y sus derivados en la prevención y el tratamiento de patologías asociadas con HMGB1. HMGB1 es una quimioquina proinflamatoria liberada por células necróticas o moribundas que conduce a una cascada de citoquinas inflamatorias en algunas patologías humanas. En una realización preferida, las solicitudes de patente internacional anteriormente mencionadas describen el uso novedoso de K-252a y sus derivados como agentes terapéuticos para la prevención y el tratamiento de la restenosis. K-252a tiene, de hecho, la capacidad de bloquear/inhibir la migración y proliferación de células del músculo liso arterial inducida por HMGB1, acontecimientos que están ambos en la base de la formación de la restenosis. A este fin, K-252a y sus derivados se cargan como revestimiento superficial uniéndose, incluyéndose o adsorbiéndose en un dispositivo médico, en particular, en una prótesis endovascular, a fin de liberar el principio activo in situ.

Además del propio K-252a, se han sintetizado y probado varios derivados de k-252a para establecer su actividad biológica. Como ejemplo, CEP1347, un derivado de K252a, retiene propiedades neuroprotectoras pero no inhibe TrkA, CEP1347 ha mostrado inhibir directamente los MAPKKK, incluyendo MLK3 (Roux y col., J. Biol. Chem. 277: 49473-49480, 2002). Se ha investigado otro derivado de K-252a, KT5926, frente a la replicación del virus de la estomatitis vesicular (VSV) en células BHK-21 (Kim y col., Biol. Pharm. Bull. 21:498-505, 1998). Se sabe que los

análogos de K-252a con sustituciones conservativas en C3' retienen la potencia frente a una gama de quinasas (Schneider y col., Org. Lett. 7: 1695-1698, 2005).

La eficacia de fármacos administrados sistémicamente in vivo puede verse impedida por factores tales como una mala solubilidad a pH fisiológico y una rápida eliminación mediante la filtración glomerular, el aclaramiento y el metabolismo celular. En muchos casos, dichos efectos desventajosos evitan un uso terapéutico eficaz de dichos agentes. Una estrategia satisfactoria para mejorar la eficacia y la duración de los efectos del agente y para reducir los potenciales efectos toxicológicos es la unión covalente de un agente biológicamente activo a diversos polímeros. Uno de los polímeros que se usa más a menudo para mejorar las propiedades farmacológicas y toxicológicas de un agente activo es el polialquilenóxido polietilenglicol. PEG en forma abreviada.

Los polímeros de polietilenglicol (PEG), que son anfífilos, no tóxicos, e inmunológicamente inertes, pueden conjugarse con agentes farmacéuticos para manipular muchas de las propiedades farmacocinéticas y toxicológicas. En el campo de la administración de fármacos, los derivados de PEG se han utilizado ampliamente en la unión covalente (es decir, la "PEGilación") a proteínas a fin de reducir la inmunogenicidad, la proteólisis y el aclaramiento del riñón y para aumentar la solubilidad (Zalipsky, Adv. Drug Del. Rev. 16: 157-182, 1995). PEG se ha vinculado a fármacos relativamente hidrófobos de bajo peso molecular a fin de reducir la toxicidad, alterar la distribución, y aumentar la solubilidad. Los agentes farmacéuticos pegilados pueden ser más eficaces que sus fármacos progenitores sin modificar en virtud de las propiedades de PEG que se transfieren a los conjugados (Molineux, Pharmacotherapy 23: 3S-8S, 2003).

El objetivo de la presente invención fue aprovechar las características peculiares de algunos polímeros, en particular de polietilenglicol (PEG) para desarrollar formas de administración terapéuticamente útiles de los miembros de la familia del indolocarbazol. El objetivo de los inventores de la invención ha sido obtener mediante la modificación de PEG un comportamiento farmacocinético y toxicológico mejorados del compuesto de indolocarbazol conjugado con polímero. Además, ha sido también el objetivo de la invención conseguir un cambio en el perfil de actividad y/o toxicidad de los nuevos conjugados.

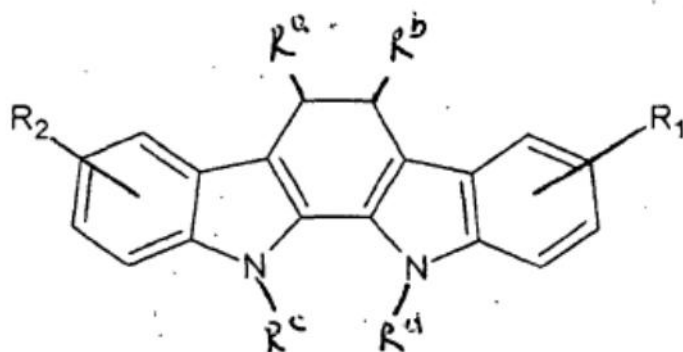
Uno de los problemas específicos que subyacen en la presente invención era aprovechar las características peculiares de algunos polímeros, en particular de PEG, para desarrollar formas de administración de K-252a que permitan un comportamiento farmacocinético y toxicológico mejorados, consiguiendo la mejor biodisponibilidad de K-252a o de su derivado en las diversas rutas de aplicación posibles. En un aspecto concreto de la presente invención, el problema ha sido aprovechar las características del polímero para conseguir, en el caso de una administración tópica, una disminución de la absorción de K-252a o sus derivados y por tanto una reducción o incluso la eliminación de posibles efectos de toxicidad sistémicos y/o secundarios.

La presente invención se dirige por tanto a novedosos conjugados poliméricos de miembros de compuestos de indolocarbazol y en particular de K-252a o de sus derivados, a su preparación y su uso, donde el conjugado polimérico tiene una mayor solubilidad en agua, una manejabilidad farmacéutica mejorada, una farmacocinética y biodisponibilidad mejoradas y/o una toxicidad y/o inmunogenicidad disminuidas en comparación con los compuestos de indolocarbazol o con el compuesto K-252a o sus derivados.

En un aspecto preferido concreto, la presente invención se dirige a un conjugado polimérico de K-252a o de sus derivados, a su preparación y su uso, donde, tras la administración tópica, la absorción sistémica está limitada y por tanto, la toxicidad sistémica y/o los efectos secundarios se reducen o incluso se eliminan.

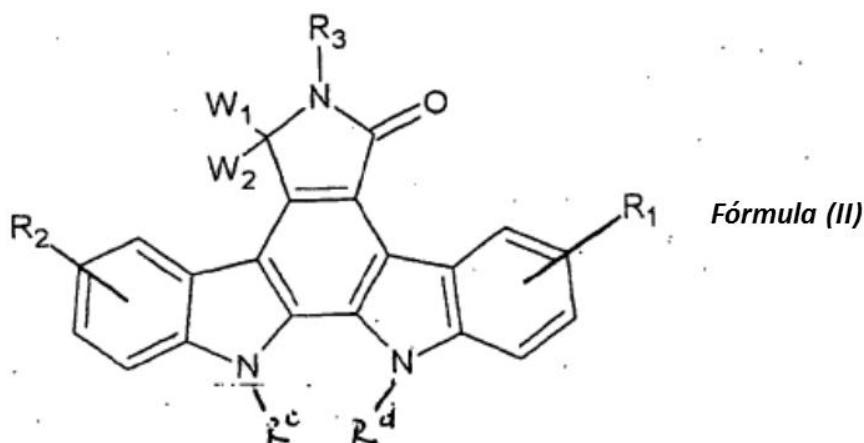
La invención se define mediante el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

Un primer aspecto de la presente invención es por tanto un conjugado polimérico de un compuesto de indolocarbazol de la fórmula general (I):



Fórmula (I)

y preferentemente de fórmula general (II)



donde R^a y R^b son de forma independiente un hidrógeno o un resto orgánico seleccionado entre el grupo que consiste en alquilo inferior sustituido o no sustituido, alqueno inferior sustituido o no sustituido, alquino inferior sustituido o no sustituido, hidroxilo, alcoxi inferior, carboxilo o alcóxicarbonilo; o

R^a y R^b juntos forman una estructura cíclica de 5-7 miembros, preferentemente de 5 miembros condensada directamente con la estructura del núcleo de indolo[2,3-a]carbazol, que contiene 0, 1 o 2 heteroátomos, preferentemente átomos de nitrógeno, y que contiene opcionalmente un grupo carbonilo y estando la estructura cíclica no sustituida o sustituida por al menos un grupo sustituyente seleccionado a partir de un grupo carbonilo o W_1 o W_2 y donde si un miembro heteroátomo de la estructura cíclica es nitrógeno, el nitrógeno está sustituido por el resto R_3 ;

y donde R^c y R^d son

(a) de forma independiente hidrógeno o un resto orgánico seleccionado entre el grupo que consiste de alquilo inferior sustituido o no sustituido, alqueno inferior sustituido o no sustituido, alquino inferior sustituido o no sustituido, hidroxilo, alcoxi inferior, carboxilo o alcóxicarbonilo; o

uno de R^c y R^d se selecciona entre hidrógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido e hidroxilo, mientras que el otro uno de R^c y R^d es un resto cíclico de 3-7 miembros, preferentemente un resto cíclico de 5 o 6 miembros, preferentemente un resto carbohidrato cíclico, donde el resto cíclico está no sustituido o sustituido, preferentemente sustituido por al menos un grupo funcional adecuado para la conjugación de un resto polimérico, de forma más preferente sustituido en al menos uno, preferentemente 2 a 3 y hasta en todas las posiciones del ciclo por hidroxilo, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alcoxi inferior, carboxilo, alcóxicarbonilo, amino, alquilamino inferior, alquilaminocarbonilo inferior o un grupo oxima; o

(b) R^c y R^d juntos forman un resto cíclico de 3-7 miembros, preferentemente un resto cíclico de 5 o 6 miembros, preferentemente un resto de hidrato de carbono cíclico, sustituido preferentemente por al menos un grupo funcional adecuado para la conjugación de un resto polimérico, sustituido de forma más preferente en al menos uno, preferentemente dos o tres, y hasta en todas las posiciones del ciclo por hidroxilo, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alcoxi inferior, carboxilo, alcóxicarbonilo, amino, alquilamino inferior, alquilaminocarbonilo inferior y/o un grupo oxima,

y donde los restos R_1 , R_2 , R_3 , W_1 y W_2 se definen tal como se describe a continuación; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

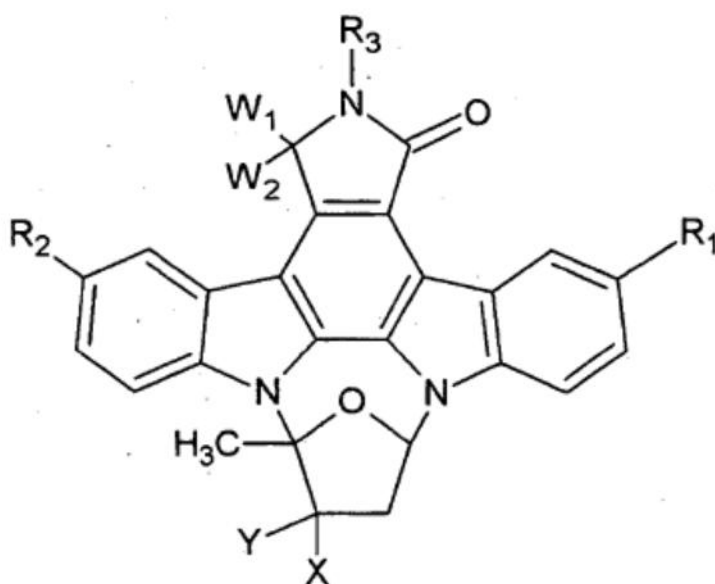
Los compuestos (I) y (II) tienen al menos un grupo funcional al cual se conjuga un resto polimérico, localizado preferentemente en el radical R^c y/o R^d . El conjugado puede comprender uno o varios restos poliméricos, por ejemplo, uno, dos, tres o más restos poliméricos. Preferentemente los compuestos conjugados de la presente invención comprenden un resto polimérico.

El resto cíclico de 3-7 miembros, preferentemente el resto carbohidrato cíclico se une al compuesto del indolocarbazol mediante su unión a un nitrógeno del indol o mediante unión a ambos nitrógenos del indol de la estructura del indolocarbazol. Por tanto, la unión puede incluir un único indol o dos índoles y se proporciona preferentemente mediante uno o dos enlaces N-glicosídicos.

Preferentemente, el resto cíclico de 3-7 miembros, preferentemente el resto carbohidrato cíclico, es un grupo furano sustituido o un grupo pirano sustituido. Por tanto, los compuestos conjugados con el polímero preferido son compuestos de indolocarbazol ciclofuranosilados o compuestos de indolocarbazol ciclopiranosilados. Los compuestos de indolocarbazol ciclofuranosilados preferidos que de acuerdo con la invención se conjugan con un resto polimérico se pueden seleccionar entre K-252a, K-252b, ICP-1. Los compuestos de indolocarbazol ciclopiranosilados preferidos se pueden seleccionar entre Estaurosporina, K-252d, TAN-1030a, RK-286c, MLR-52, Rebecamicina, UNC-01, UNC-02 y RK-1409B.

El al menos un resto polimérico se conjuga con el compuesto de fórmulas (I) y/o (II) mediante un enlace químico covalente a fin de proporcionar un conjugado estable. En concreto, el resto polimérico se une a los compuestos de las fórmulas generales (I) y/o (II) mediante la unión a un grupo funcional seleccionado entre hidroxilo, amino, carboxi, alcoxycarbonilo o aminocarbonilo. En la realización muy preferida de la invención, el resto polimérico se une al compuesto de las fórmulas generales (I) y/o (II) en uno de los restos R^c y R^d , particularmente de forma preferente en el resto carbohidrato cíclico identificado por los restos R^c y R^d . El resto polimérico del compuesto de la invención así como el enlace químico preferido por el cual el polímero se puede unir al compuesto de indolocarbazol de las fórmulas (I) y/o (II) se describen a continuación.

Un aspecto muy preferido de la presente invención es un conjugado polimérico, que se representa por la siguiente fórmula (III):



Fórmula (III)

donde R^1 y R^2 son restos iguales o diferentes y se seleccionan cada uno de forma independiente entre el grupo que consiste en:

a) hidrógeno, halógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alqueno inferior sustituido o no sustituido, alquino inferior sustituido o no sustituido, hidroxi, alcoxi inferior, carboxi, alcoxycarbonilo inferior, acilo, nitro, carbamoilo, alquilaminocarbonilo inferior, $-NR^5R^6$, donde R^5 y R^6 se seleccionan cada uno de forma independiente entre hidrógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alqueno inferior sustituido o no sustituido, alquino inferior sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, aralquilo sustituido o no sustituido, alquilaminocarbonilo sustituido o no sustituido, arilaminocarbonilo sustituido o no sustituido, alcoxycarbonilo, carbamoilo, acilo o R^5 y R^6 se combinan con un átomo de nitrógeno procedente de un grupo heterocíclico,

b) $-CO(CH_2)_jR^4$, donde j es 1 a 6 y R^4 se selecciona entre el grupo que consiste en

(i) hidrógeno, halógeno, $-N_3$,

(ii) $-NR^5R^6$, donde R^5 y R^6 son tal como se ha definido anteriormente,

(iii) $-SR^7$, donde R^7 se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alqueno inferior sustituido o no sustituido, alquino inferior sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, aralquilo sustituido o no sustituido, $-(CH_2)_aCO_2R^{10}$, (donde a es 1 o 2, y donde R^{10} se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo inferior sustituido o no sustituido) y $-(CH_2)_aCO_2NR^5R^6$, (donde a y R^5 y R^6 son tal como se ha definido anteriormente)

(iv) $-OR^8$, $-OCOR^8$, donde R^8 se selecciona entre hidrógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alqueno inferior sustituido o no sustituido, alquino inferior sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido

c) $-CH(OH)(CH_2)_jR^4$ donde j y R^4 son tal como se ha definido anteriormente;

d) $-(CH_2)_dCHR^{11}CO_2R^{12}$ o $-(CH_2)_dCHR^{11}CONR^5R^6$, donde d es 0 a 5, R^{11} es hidrógeno, $-CONR^5R^6$, o $-CO_2R^{13}$ (donde R^{13} es hidrógeno o un alquilo inferior sustituido o no sustituido) y R^{12} es hidrógeno o un alquilo inferior

sustituido o no sustituido;

e) $-(CH_2)_kR^{14}$ es 2 a 6 y R^{14} es halógeno, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, $-COOR^{15}$, $-OR^{15}$, (donde R^{15} es hidrógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alquenilo inferior sustituido o no sustituido, alquinilo inferior sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido o acilo), $-SR^7$ (donde R^7 es tal como se ha definido anteriormente) $-CONR^5R^6$, $-NR^5R^6$ son tal como se ha definido anteriormente) o $-N_3$;

f) $-CH=CH(CH_2)_mR^{16}$, donde m es 0 a 4, y R^{16} es hidrógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alquenilo inferior sustituido o no sustituido, alquinilo inferior sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, $-COOR^{15}$, $-OR^{15}$ (donde R^{15} es tal como se ha definido anteriormente) $-CONR^5R^6$ o $-NR^5R^6$ (donde R^5 y R^6 son tal como se ha definido anteriormente);

g) $-CH=C(CO_2R^{12})_2$ donde R^{12} es tal como se ha definido anteriormente;

h) $-C\equiv C(CH_2)_nR^{16}$, donde n es 0 a 4 y R^{16} es tal como se ha definido anteriormente;

(i) $-CH_2OR^{22}$, donde R^{22} es trialquilo inferior en el que tres grupos de alquilo inferior son iguales o diferentes o donde R^{22} tiene el mismo significado que R^8 .

(j) $-CH(SR^{23})_2$ y $-CH_2-SR^7$ donde R^{23} es alquilo inferior, alquenilo inferior o alquinilo inferior y donde R^7 es tal como se ha definido anteriormente

R^3 es hidrógeno, halógeno, acilo, carbamoilo, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo inferior sustituido o no sustituido o amino;

X representa $-L^1-X'$ e Y representa $-L^2-Y'$, donde al menos uno de X' e Y' es un polímero, tanto lineal como ramificado, que se une mediante L^1 y/o L^2 al resto de tetrahidrofurano del compuesto de fórmula (III); L^1 y/o L^2 son un enlace químico covalente o un grupo enlazador que une al resto de tetrahidrofurano al polímero X' y/o Y' ;

cuando Y' es un polímero, y X' no es un polímero, L^1 es un enlace químico covalente y X se selecciona entre el grupo que consiste en

(a) hidrógeno, hidroxialquilo inferior, acilo, carboxi, alcoxicarbonilo inferior,

(b) $-CONR^{17a}R^{17b}$, donde R^{17a} y R^{17b} se seleccionan cada uno de forma independiente entre

(i) hidrógeno, alquilo inferior, alquenilo inferior, alquinilo inferior,

(ii) $-CH_2R^{18}$, donde R^{18} es hidroxilo, o

(iii) $-NR^{19}R^{20}$, donde R^{19} o R^{20} se seleccionan cada uno de forma independiente entre hidrógeno, alquilo inferior, alquenilo inferior, alquinilo inferior o R^{19} o R^{20} son de forma independiente el resto de un aminoácido α en el que se excluye el grupo hidroxilo del grupo carboxilo, o R^{19} o R^{20} se combinan con un átomo de nitrógeno para formar un grupo heterocíclico; y

(c) $-CH=N-R^{21}$, donde R^{21} es hidroxilo, alcoxi inferior, amino, guanidino, o imidazolilamino;

cuando X' es un polímero, e Y' no es un polímero, L^2 es un enlace químico covalente e Y' se selecciona entre hidroxilo, alcoxi inferior aralquilo, o aciloxi;

W^1 y W^2 son de forma independiente hidrógeno, hidroxilo o W^1 y W^2 juntos representan oxígeno; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

El término "alquilo inferior", cuando se usa solo o en combinación con otros grupos, significa un grupo alquilo inferior de cadena lineal o ramificada que contiene de 1-6 átomos de carbono, preferentemente 1-5, de forma más preferente 1-4 y de manera especialmente preferente 1-3 o 1-2 átomos de carbono. Estos grupos incluyen en particular, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, amilo, isoamilo, neopentilo, 1-etilpropilo, hexilo, y similares. El resto alquilo inferior de los grupos "alcoxi inferior", el "alcoxicarbonilo inferior", el "alquilaminocarbonilo inferior", el "hidroxialquilo inferior" y del "trialquilsililo inferior" tiene el mismo significado que el "alquilo inferior" definido anteriormente.

Los grupos "alquenilo inferior" se definen como grupos alquenilo C_2-C_6 que pueden ser de cadena lineal o ramificada y pueden estar en la forma Z o E. dichos grupos incluyen vinilo, propenilo, 1-butenilo, isobutenilo, 2-butenilo, 1-pentenilo, (Z)-2-pentenilo, (E)-2-pentenilo, (Z)-4-metil-2-pentenilo, (E)-4-metil-2-pentenilo, pentadienilo, por ejemplo, 1, 3 o 2,4-pentadienilo y similares. Los grupos C_2-C_6 más preferidos son los grupos alquenilo C_2-C_5 , C_2-C_4 e incluso de forma más preferente los grupos alquenilo C_2-C_3 .

El término grupos "alquinilo inferior" se refiere a los grupos alquinilo C_2-C_6 que pueden ser de cadena lineal o ramificada e incluyen etinilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1-pentinilo, 3-pentinilo, 1-hexinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo y similares. Los grupos alquinilo C_2-C_6 más preferidos son los grupos alquinilo C_2-C_5 , C_2-C_4 e incluso se prefieren más los grupos alquinilo C_2-C_3 .

El término grupo “arilo” se refiere a grupos arilo C_6-C_{14} que contienen de 6 hasta 14 átomos de carbono en el anillo. Estos grupos pueden ser mono, bi o tricíclicos y son anillos fusionados. Los grupos arilo preferidos incluyen fenilo, bifenilo, naftilo, antraceno, fenantreno y similares. El resto arilo de los grupos “arilcarbonilo” y “arilaminocarbonilo” tienen el mismo significado que se ha definido anteriormente.

5 El término grupos “heteroarilo” puede contener 1 a 3 heteroátomos seleccionados de forma independiente entre nitrógeno, azufre u oxígeno y se refiere a grupos heteroarilo C_3-C_{13} . Estos grupos pueden ser mono, bi o tricíclicos. Los grupos heteroarilo C_3-C_{13} de la presente invención incluyen grupos heteroaromáticos y grupos heterocíclicos saturados y parcialmente saturados. Estos grupos heterocíclicos pueden ser monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos. Los
10 grupos heterocíclicos de 5 o 6 miembros preferidos son tienilo, furilo, pirrolilo, piridilo, piranilo, morfolinilo, pirazinilo, metilpirrolilo, y piradizino. El heteroarilo C_3-C_{13} puede ser un grupo heterocíclico bicíclico. Los grupos heterocíclicos bicíclicos preferidos son benzofurilo, benzotienilo, indolilo, imidazolilo, y pirimidinilo. Los heteroarilos C_3-C_{13} más preferidos son furilo y piridilo.

15 El término “alcoxi inferior” incluye grupos alcoxi que contienen de 1 a 6 átomos de carbono, preferentemente 1 a 5, de forma más preferente 1-4 y de manera especialmente preferente 1 a 3 o 1 a 2 átomos de carbono y pueden ser de cadena lineal o ramificada. Estos grupos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, isopropoxi, terc-butoxi, pentoxi, hexoxi y similares.

20 El término “acilo” incluye alcanilo inferior que contiene 1 a 6 átomos de carbono, preferentemente de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3 o de 1 a 2 átomos de carbono y puede ser de cadena lineal o ramificada. Estos grupos incluyen preferentemente formilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, butirilo terciario, pentanoilo y hexanoilo. El resto acilo del grupo “aciloxi” tiene el mismo significado que el definido anteriormente.

25 El término “halógeno” incluye flúor, cloro, bromo, yodo, y similares.

El término grupo “aralquilo” se refiere a aralquilo C_7-C_{15} donde el grupo alquilo está sustituido por un arilo. El grupo alquilo y arilo se puede seleccionar entre grupos alquilo C_1-C_6 y los grupos arilo C_6-C_{14} tal como se ha definido anteriormente, donde el número total de átomos de carbono está entre 7 y 15. Los grupos aralquilo C_7-C_{15} preferidos
30 son bencilo, feniletilo, fenilpropilo, fenilisopropilo, fenilbutilo, difenilmetilo, 1,1-difeniletilo, 1,2-difeniletilo. El resto aralquilo de los grupos “aralquilo” tiene el mismo significado que se ha definido anteriormente.

Los grupos alquilo, alqueno y alquino inferior sustituidos tienen 1 a 3 sustituyentes seleccionados de forma independiente, tales como alquilo inferior, hidroxilo, alcoxi inferior, carboxilo, alcoxycarbonilo inferior, nitro, halógeno, amino, mono o dialquilamino inferior, dioxolano, dioxano, ditiolano, y ditiona. El resto sustituyente de alquilo inferior
35 de los grupos alquilo, alqueno y alquino inferior sustituidos, y el resto alquilo inferior del alcoxi inferior, el alcoxycarbonilo inferior, y los sustituyentes mono o dialquilo inferior de los grupos alquilo, alqueno y alquino inferior sustituidos tienen el mismo significado que “alquilo inferior” definido anteriormente.

40 Los grupos arilo sustituido, heteroarilo sustituido y aralquilo sustituido tienen de 1 a 3 sustituyentes seleccionados de forma independiente, tales como alquilo inferior, hidroxilo, alcoxi inferior, carboxilo, alcoxycarbonilo inferior, nitro, amino, mono o dialquilamino inferior, y halógeno. El resto alquilo inferior de los grupos alquilo inferior, alcoxi inferior, alcoxycarbonilo inferior y los grupos mono o dialquilamino inferior entre los sustituyentes tienen el mismo significado que el alquilo inferior definido anteriormente.

45 El grupo heterocíclico formado por R^5 y R^6 combinados con un átomo de nitrógeno incluyen pirrolidinilo, piperidinilo, piperidino, morfolinilo, morfolino, tiomorfolino, N-metilpiperazinilo, indolilo, e isoindolilo.

Los grupos de α -aminoácido incluyen glicina, alanina, prolina, ácido glutámico y lisina, que puede estar en la forma L, la forma D o en la forma de un racemato.

50 Preferentemente, R^1 y R^2 se seleccionan de forma independiente entre el grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, nitro, $-CH_2OH$, $-(CH_2)_kR^{14}$, $-CH=CH(CH_2)_mR^{16}$, $-C\equiv C(CH_2)_nR^{15}$, $-CO(CH_2)_jR^4$ donde R^4 es $-SR^7$, alquilo inferior (sustituido o no sustituido con CH_2O (donde el alquilo inferior sustituido es preferentemente metoximetilo, metoxietilo o etoximetilo), $-NR^5R^6$.

En los significados anteriormente preferidos de R^1 y R^2 , el resto R^{14} se selecciona preferentemente entre fenilo, piridilo, imidazolilo, tiazolilo, tetrazolilo, $-COOR^{15}$, $-OR^{15}$ (donde R^{15} se selecciona preferentemente entre hidrógeno, metilo, etilo, fenilo o acilo), $-SR^7$ (donde R^7 se selecciona preferentemente entre alquilo inferior sustituido o no sustituido, 2-tiazolina y piridilo) y $-NR^5R^6$ (donde R^5 y R^6 se seleccionan preferentemente entre hidrógeno, metilo, etilo, fenilo, carbamoilo y alquilaminocarbonilo inferior). Además, el resto R^{16} se selecciona preferentemente entre hidrógeno, metilo, etilo, fenilo, imidazol, tiazol, tetrazol, $-COOR^{15}$, $-OR^{15}$ y NR^5R^6 (donde los restos R^{15} , R^5 y R^6 tienen los significados preferidos que se han descrito anteriormente). En los significados anteriormente preferidos de R^1 y R^2 , el resto R^7 se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en alquilo bajo sustituido o no sustituido, fenilo sustituido o no sustituido, piridilo, pirimidinilo, tiazol y tetrazol. Además k es preferentemente 2, 3 o 4, j es preferentemente 1 o 2 y m y n son de forma independiente preferentemente 0 o 1.

Preferentemente R^3 es hidrógeno o acetilo, lo más preferente hidrógeno.

Preferentemente, cada uno de W_1 y W_2 es hidrógeno.

- 5 Cuando Y' es un polímero, y X' no es un polímero, X' se selecciona preferentemente entre carboxi, hidroximetilo o un alcóxicarbonilo inferior, prefiriéndose particularmente metóxicarbonilo y carboxilo.

Cuando X' es un polímero, e Y' no es un polímero, Y' se selecciona preferentemente entre hidroxilo o acetiloxi, lo más preferido hidroxilo.

- 10 Una realización muy preferida de la presente invención se refiere al compuesto K252-a conjugado en la posición x y/o Y con un polímero. Por tanto, en una realización muy preferida de la presente invención, el conjugado polimérico de fórmula (III) se representa por un compuesto donde R_1 , R_2 , R_3 , W_1 , y W_2 son hidrógeno y al menos uno de X' e Y' es un polímero, en el que si Y' es un polímero, y X' no es un polímero, X' es metóxicarbonilo, y si X' es un polímero, e Y' no es un polímero, Y' es hidroxilo.

- 15 Una realización muy preferida de la presente invención se refiere al compuesto K252-b conjugado en la posición X y/o Y con un polímero. Por tanto, en una realización muy preferida de la presente invención, el conjugado polimérico de fórmula (III) se representa por un compuesto donde R_1 , R_2 , R_3 , W_1 , y W_2 son hidrógeno y al menos uno de X' e Y' es un polímero, en el que si Y' es un polímero, y X' es carbonilo, y si X' es un polímero, e Y' no es un polímero, Y' es hidroxilo.

- 20 Los compuestos de la presente invención se pueden preparar como sales farmacéuticamente aceptables que incluyen sales de ácidos inorgánicos tales como ácidos clorhídrico, yodhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, ácido nítrico y ácido sulfúrico así como sales de ácidos orgánicos, tales como ácidos tartárico, acético, cítrico, málico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico, aril sulfónico (por ejemplo, ácidos p-toluenosulfónico, bencenosulfónico), fosfórico, malónico, y similares. Los expertos en la técnica conocen los ácidos adecuados para la formación de sales farmacéuticamente aceptables. Además, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención se pueden formar con un catión farmacéuticamente aceptable. Las personas expertas en la técnica conocen los cationes farmacéuticamente aceptables e incluyen cationes alcalinos (Li^+ , Na^+ , K^+), cationes alcalinotérreos (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}), amonio y cationes orgánicos, tales como cationes de amonio cuaternario.

- 35 El resto polimérico de acuerdo con la presente invención, que, por ejemplo, se representa en la fórmula general (III) por X' y/o Y' , ha de ser biocompatible, puede ser de origen natural o semisintético o sintético y puede tener una estructura lineal o ramificada. Los polímeros a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileo, ácido poliacrílico, poliácridatos, poliácridamida o derivados de N-alquilo de los mismos, ácido polimetacrílico, polimetacrilatos, ácido polietilacrílico, polietilacrilatos, polivinilpirrolidona, poli (alcohol vinílico), ácido poliglicólico, ácido poliláctico, ácido poli (láctico-co-glicólico), dextrano, quitosán, poliaminoácidos.

- 40 En una realización muy preferida de la presente invención, el polímero es el grupo polietilenglicol (PEG), donde el grupo OH terminal puede estar opcionalmente modificado, por ejemplo, con grupos alquilo C_1 - C_5 o grupos acilo C_1 - C_5 , preferentemente con grupos alquilo C_1 -, C_2 -, o C_3 - o grupos C_1 -, C_2 - o C_3 . Preferentemente, el polietilenglicol modificado es metoxi-polietilenglicol (mPEG).

- 45 El polímero utilizado de acuerdo con la presente invención tiene un peso molecular que varía desde 100 a 100.000 Da, preferentemente desde 200 a 50.000 Da, y de forma más preferente desde 500 a 10.000 Da. De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, el polímero es un PEG de cadena corta que tiene preferentemente un OH terminal y/o un grupo metoxi con un peso molecular que varía desde 200 a 1500 Da, preferentemente desde 400 a 1200 Da e incluso de forma más preferente desde 550 a 1100. En la realización más preferida, el PEG de cadena corta tiene un peso molecular promedio de 550 Da o de 1100 Da. De acuerdo con un segundo aspecto preferido de la invención, el polímero es un PEG de cadena larga que tiene preferentemente un OH terminal y/o un grupo metoxi, con un peso molecular que varía desde 4.000 a 6.000 Da, y preferentemente desde 4.500 a 5.500 Da. En la realización más preferida de este aspecto de la invención, se utiliza un PEG o mPEG de cadena larga con un peso molecular promedio de 2.000 Da o de 5.000 Da.

- 50 La cadena de polímero del conjugado polimérico de las fórmulas (I), (II) y/o (III) se conjuga mediante un enlace químico covalente con el agente activo a fin de proporcionar un conjugado estable. La Fig. 1A y la Fig. 1B muestran, por ejemplo, el conjugado polimérico preferido de fórmula (III). El polímero puede unirse directamente al compuesto de las fórmulas (I) o (II) o al derivado de K-252a de fórmula (III). En este caso de fórmula (III), L^1 y L^2 son un enlace covalente.

- 55 En una realización preferida de la presente invención, los restos de polímero se unen al derivado de indolocarbazol utilizando un grupo enlazador. En la realización preferida del compuesto de fórmula (III), el resto polimérico X' y/o Y' se unen mediante un grupo enlazador, en el que en esta realización, L^1 y L^2 representan el grupo enlazador. En la realización preferida de fórmula (III) de la presente invención, el término grupo enlazador L^1 y/o L^2 significan un

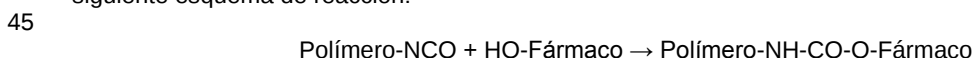
grupo que se obtiene mediante la reacción química del resto en la posición C3 del resto de tetrahydrofurano de la fórmula (III) y el grupo reactivo en el resto polimérico. Por tanto, L^1 y L^2 , que acoplan los restos poliméricos X' e Y' con el anillo de tetrahydrofurano, pueden representar un grupo enlazador tal como se ha definido anteriormente.

5 El grupo enlazador puede ser cualquier resto conocido por los expertos en la técnica de la conjugación de polímeros, obtenido mediante la reacción del grupo funcional adecuado para la conjugación en los compuestos de indolocarbazol de fórmulas (I) o (II), preferentemente en el resto cíclico R^c y/o R^d o en el sustituyente en el anillo de tetrahydrofurano de fórmula (III) y el polímero o el polímero activado mediante un grupo reactivo. El grupo enlazador a modo de ejemplo, por ejemplo, los grupos L^1 y/o L^2 a modo de ejemplo, incluyen, sin limitación enlaces éster, éter, 10 acetal, cetel, éter de vinilo, carbamato, urea, amina, amida, enamina, imina, oxima, amidina, iminoéster, carbonato, ortoéster, fosfonato, fosfinato, sulfonato, sulfinato, sulfuro, sulfato, disulfuro, sulfonamida, sulfonamida, tioéster, arilo, silano, siloxano, heterociclos, tiocarbonato, tiocarbamato, y fosfonamida. Preferentemente, los grupos enlazadores o en particular L^1 y L^2 se seleccionan entre un enlace carbamato, un enlace éter, un enlace éster, un enlace de carbono, un enlace amida y/o un enlace amina.

15 Además, el grupo enlazador puede contener opcionalmente uno o más grupos separadores. En el contexto de la presente invención, un grupo separador se define como un grupo bifuncional que tiene en ambos extremos un grupo terminal funcional reactivo. Mediante uno de los grupos reactivos de su extremo, el separador reacciona con el resto polimérico, por ejemplo X' e Y' , o con el grupo reactivo del resto polimérico. Con el otro grupo funcional en el otro extremo, el grupo separador se une al grupo funcional adecuado para la conjugación en los compuestos de indolocarbazol de fórmulas (I) o (II), preferentemente en el resto cíclico R^c y/o R^d , o con el anillo de tetrahydrofurano de fórmula (III), preferentemente con el resto en la posición C3 del anillo de tetrahydrofurano de fórmula (III). Los expertos en la técnica conocen los grupos separadores adecuados. Los ejemplos de grupos separadores incluyen, pero no se limitan a moléculas pequeñas heterofuncionales, bifuncionales o un polímero. Por ejemplo, el grupo 20 separador puede estar representado por grupos alquilo C_6 - C_{12} bifuncionales o grupos alquilo heterobifuncionales que contienen entre 1 – 3 heteroátomos seleccionados entre N, S y O una cadena intermedia de PEG bifuncional corto.

En una realización más preferida, el polímero, representado en la fórmula general (III) por X' o Y' , se une 30 preferentemente de forma covalente directamente o mediante un grupo separador a un átomo de oxígeno derivado del grupo hidroxilo en la posición C3 del resto de tetrahydrofurano del derivado de K-252a. En esta realización preferida, en la fórmula general (III), Y' representa el resto polimérico y L^2 es preferentemente un carbamato o un enlace éter (Fig. 1a). En una realización alternativa más preferida, el polímero se conjuga de forma covalente directamente o mediante un grupo separador con un grupo carbonilo derivado del grupo metiléster en la posición C3 35 del resto de tetrahydrofurano del resto de tetrahydrofurano del derivado de K-252a. En esta realización alternativa, en la fórmula general (III), X' representa el resto polimérico y L^1 es preferentemente un enlace amida o amina (Fig. 1b).

La unión covalente del resto polimérico con los compuestos de indolocarbazol de fórmulas (I), (II), o (III) se consigue mediante síntesis química conocida. En particular, la unión covalente del polímero con K-252a o sus derivados para 40 obtener los compuestos de fórmula (III) se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas de síntesis química. Por ejemplo, en una realización a modo de ejemplo de la presente invención, la conjugación polimérica de K-252a o sus derivados se puede llevar a cabo haciendo reaccionar un polímero activado con isotiocianato con K-252a o sus derivados en condiciones de reacción adecuadas como se representa gráficamente de forma general mediante el siguiente esquema de reacción:



De acuerdo con este esquema de síntesis, la Fig. 2 muestra un ejemplo de la presente invención, donde se obtiene un compuesto de fórmula (III) mediante la reacción del resto polimérico Y' que es un PEG activado con isotiocianato y 50 el grupo hidroxilo en la posición C3 del resto de tetrahydrofurano de K-252a. La conjugación entre el polímero y K-252a se obtiene por tanto mediante el grupo enlazador L^2 que es un grupo enlazador de carbamato.

En la presente invención, se ha encontrado de manera sorprendente que, en comparación con los miembros de los compuestos de indolocarbazol y en particular con K-252a o sus derivados, los compuestos de fórmula (I), (II) y/o (III) 55 presentan un comportamiento farmacocinético y toxicológico mejorados debido a un aumento de su solubilidad, que conduce a una mejora de la biodisponibilidad. En otro aspecto de la presente invención, se ha encontrado de manera sorprendente que los compuestos de fórmulas (I), (II) y/o (III) muestra una absorción sistémica limitada tras la administración tópica debido a su tamaño molecular e hidrofiliidad aumentados, reduciendo de esta manera la toxicidad sistémica y/o sus efectos secundarios (véase el Ejemplo 2).

60 Los inventores de la presente solicitud han encontrado de manera sorprendente que los conjugados del polímero K-252a de fórmula (I), (II) y/o (III) presentan un aumento significativo en la selectividad de la actividad inhibidora frente a la tirosina quinasa TrkA en comparación con la actividad inhibidora de la quinasa no selectiva de los propios compuestos de indolocarbazol y en particular de K-252a y sus derivados (véase el Ejemplo 3). De esta manera, la 65 conjugación de un compuesto de indolocarbazol y en particular de K-252a con una molécula de polímero de acuerdo con la invención conduce a la provisión de un agente activo selectivo con respecto a su diana terapéutica con la

consiguiente disminución de los efectos secundarios no deseados.

Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención es el de los compuestos de fórmulas (I), (II) y/o (III) para su uso como agentes activos en un medicamento. En un aspecto preferido de la invención, los compuestos de fórmula (I), (II) y/o (III) se usan como agentes activos en un medicamento para la administración y el tratamiento sistémicos. En un aspecto preferido adicional, la invención se refiere al uso de compuestos de fórmula (I), (II), y/o (III) como agentes activos en un medicamento tópico.

En concreto, los compuestos poliméricos conjugados de la presente invención se usan como agentes activos en un medicamento útil para la prevención, alivio y tratamiento de las patologías asociadas con HMGB1.

Una patología asociada con HMGB1 es una dolencia en un paciente donde está presente un aumento de la concentración de la proteína nuclear HMGB1 y/o las proteínas homólogas de HMGB1 en la forma acetilada o no acetilada en los fluidos y tejidos biológicos, en comparación con la concentración en sujetos normales donde estas proteínas HMGB1 nucleares son prácticamente indetectables. Las HMGB1 extracelulares actúan como potentes quimioquinas proinflamatorias quimiotácticas. Las patologías asociadas a HMGB1 son por tanto patologías con una fuerte base inflamatoria, patologías que son el resultado de la estimulación de citoquinas tales como TNF-alfa, IL-1, IL-6, etc., o patologías que son el resultado de episodios tóxicos tales como intoxicación, infección, quemaduras, etc. En particular, se han encontrado y determinado elevadas concentraciones de la proteína HMGB1 y de proteínas homólogas en el plasma de pacientes con sepsia, en plasma y fluido sinovial de pacientes de artritis reumatoide, en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer, en plasma y tejidos de pacientes con melanoma, en plasma de pacientes con lupus sistémico eritematoso, en placas ateroscleróticas de pacientes ateroscleróticos, etc. La determinación y la evidencia de la proteína HMGB1 y/o de las proteínas homólogas en fluidos y tejidos biológicos pueden detectarse mediante herramientas diagnósticas comunes conocidas por las personas expertas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la detección mediante ensayos ELISA, etc.

Por tanto, una variedad de enfermedades se caracterizan por la presencia relevante de HMGB1 extracelular, que en particular incluye, pero no se limita a enfermedades inflamatorias, estenosis, restenosis, aterosclerosis, artritis reumatoide, enfermedades autoinmunes, tumores, enfermedades infecciosas, sepsia, enfermedad pulmonar inflamatoria aguda, lupus eritematoso, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades del sistema nervioso central y periférico y esclerosis múltiple. En una realización especialmente preferida, los compuestos poliméricos conjugados de las fórmulas (I), (II) y/o (III) se utilizan para la prevención, alivio y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, particularmente aterosclerosis y/o restenosis que se produce durante o después de angioplastia. De forma más preferente, el medicamento se utiliza para bloquear, retardar y/o impartir la regeneración del tejido conectivo en la restenosis durante o después de la angioplastia.

En un aspecto particularmente preferido de la invención, los compuestos poliméricos conjugados de las fórmulas (I), (II) y/o (III) son eficaces para su uso como agente activo en un medicamento para la prevención, el alivio y el tratamiento de trastornos neurológicos, neuropatías y trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso central y periférico.

Los inventores han mostrado adicionalmente que los nuevos compuestos conjugados poliméricos son capaces de reducir y/o inhibir la secreción de citoquinas en el plasma mediante tratamiento sistémico. Por tanto, los compuestos conjugados poliméricos se usan como agentes activos en un medicamento para la administración sistémica útil para la prevención, el alivio y/o el tratamiento de patologías en las que está implicado un aumento de la secreción de citoquinas en plasma. Estas patologías son preferentemente patologías en las que está implicada principalmente la secreción de TNF- α , IFN- γ , MCP-1, MIP-1 y/o RANTERS.

En particular, en el contexto de la presente invención, las patologías que se asocian con un aumento de la secreción de citoquinas en plasma incluyen, pero no se limitan a enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, lesión por reperusión tras trasplante de órganos, afecciones cardiovasculares, enfermedades obstétricas y ginecológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades alérgicas y atópicas, patologías de tumores sólidos y líquidos, enfermedades de rechazo al trasplante, enfermedades congénitas, enfermedades dermatológicas, enfermedades neurológicas, caquexia, enfermedades renales dolencias de intoxicación iatrogénica, enfermedades metabólicas e idiopáticas, y enfermedades oftalmológicas.

En una realización más preferida, los compuestos de la invención se usan como agentes activos en un medicamento para el tratamiento sistémico útil para la prevención, el alivio y/o el tratamiento de la enfermedad de Behçet, el síndrome de Sjögren, vasculitis, uveítis, retinopatías.

En otro aspecto concreto adicional de la invención, se prefiere que los compuestos poliméricos conjugados de la presente invención se usen como agentes activos en un medicamento tópico útil para la prevención, el alivio y/o el tratamiento de patologías cutáneas.

Las patologías cutáneas preferidas en el contexto de la presente invención son patologías caracterizadas por la hiperproliferación de los queratinocitos, tales como psoriasis, dermatitis atópica, eczema crónico, acné, pitiriasis

rubra pilaris, queloides, cicatrices hipertróficas y tumores de la piel, tales como queratoacantoma, carcinoma espinocelular, carcinoma de células basales. En una realización más preferida, los compuestos de la presente invención se usan como agentes activos en un medicamento tópico útil para la prevención, el alivio y el tratamiento de la psoriasis.

5 Debido al aumento de la selectividad de los compuestos de la invención en la inhibición de TrkA, un aspecto adicional de la invención es el uso de dichos compuestos conjugados en la prevención, el alivio y el tratamiento de patología en las que TrkA juega un papel crucial en el mecanismo patofisiológico, que conduce al desarrollo de las patologías. En este contexto, en una realización muy preferida de la invención, los compuestos conjugados con el
10 polímero K-252a de las fórmulas (I), (II), y/o (III) se usan como agentes activos en un medicamento para la prevención, el alivio y el tratamiento del dolor y la hiperalgesia relacionados con NGF.

Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención es el uso de un compuesto de las fórmulas (I), (II), y/o (III) opcionalmente tal como se ha definido anteriormente para la fabricación de un medicamento para la prevención, el
15 alivio o/y el tratamiento de patologías tal como se ha definido anteriormente.

Los compuestos de las fórmulas (I), (II), y/o (III) se pueden usar tanto solos como en combinación con uno o algunos agentes activos. En particular, los compuestos conjugados poliméricos de la invención se pueden usar en combinación con al menos un agente adicional capaz de inhibir un mediador temprano de la cascada de citoquinas inflamatorias, por ejemplo, un antagonista o inhibidor de una citoquina seleccionada entre el grupo que consiste en
20 TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-R α , IL-8, MIP-1 α , MIF-1 β , MIP-2, MIF e IL-6.

Los agentes adicionales que se pueden usar en combinación con los compuestos poliméricos de la invención son, por ejemplo, antagonistas e inhibidores de RAGE, antagonistas y/o inhibidores de HMGB1, antagonistas y/o
25 inhibidores de la interacción de un receptor de tipo Toll (TCR) con HMGB1, el dominio análogo a lectina del extremo N (D1) de la trombomodulina y/o un ácido nucleico o molécula análoga a ácido nucleico bicatenario sintético con una estructura de forma arqueada tal como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2006/002971.

30 El compuesto de las fórmulas (I), (II), y/o (III) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se puede administrar como tales, o en la forma de diversas composiciones farmacéuticas de acuerdo con la actividad farmacológica y el fin de la administración. Otro aspecto más de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de al menos un compuesto de las fórmulas (I), (II), y/o (III) opcionalmente junto con los portadores, adyuvantes, diluyentes o/y aditivos farmacéuticamente aceptables. Los expertos en la técnica
35 conocen los portadores, adyuvantes, diluyentes o/y aditivos y pueden por tanto aplicarse en la formulación de la composición que comprende un compuesto de la presente invención.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar de una manera conveniente conocida por una persona experta en la técnica, por ejemplo, por un médico. En particular, la composición farmacéutica de la
40 invención puede administrarse mediante inyección o infusión, en particular inyección o infusión intravenosa, intramuscular, transmucosal, subcutánea o intraperitoneal y/o mediante aplicación oral, tópica, dérmica, nasal, por inhalación, en aerosol y/o rectal, etc. La administración puede ser local o sistémica. Preferentemente, la administración del compuesto y la composición farmacéutica de la invención se puede hacer mediante administración parenteral, particularmente en la forma de disoluciones o suspensiones líquidas; o administración
45 oral, particularmente en la forma de comprimidos o cápsulas, o intranasalmente, particularmente en la forma de polvos, gotas nasales, o aerosoles; o dérmicamente, mediante, por ejemplo, pomadas, cremas, aceites, liposomas, parches transdérmicos.

De acuerdo con un aspecto de la invención, la composición farmacéutica se administra sistémicamente. En particular, los compuestos de conjugados poliméricos se pueden administrar mediante inyección o infusión, en particular mediante inyección o infusión intravenosa, intramuscular, transmucosal, subcutánea o intraperitoneal y/o
50 mediante administración oral.

En una realización todavía más preferida, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran mediante aplicación tópica, en particular mediante aplicación dérmica. En el caso de una aplicación dérmica la administración de los compuestos de la presente invención puede hacerse en la forma de liposomas.
55

En una realización adicionalmente más preferida de la invención, las composiciones farmacéuticas se administran inmovilizadas de forma reversible sobre la superficie de un dispositivo médico, en particular mediante unión, revestimiento y/o inclusión del compuesto y la composición de la invención en un dispositivo médico, tal como, pero sin limitarse a, prótesis endovasculares, catéteres, instrumentos quirúrgicos, cánulas, válvulas cardíacas, o prótesis vasculares. Tras poner en contacto el dispositivo médico con el fluido corporal o el tejido corporal, los compuestos inmovilizados de forma reversible se liberan. Por consiguiente, los dispositivos médicos revestidos actúan como dispositivos de administración de fármacos eluyendo el medicamento, mientras que la cinética de administración del fármaco se puede controlar, proporcionando, por ejemplo, una liberación inmediata o una administración controlada, retrasada o continua del fármaco. Las personas expertas en la técnica conocen bien las tecnologías de
60
65

revestimiento de los dispositivos médicos.

La composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas. Para aplicaciones diagnósticas, el compuesto de las fórmulas (I), (II), y/o (III) puede estar presente en una forma marcada, por ejemplo, en una forma que contiene un isótopo, por ejemplo, un isótopo radioactivo o un isótopo que se pueda detectar mediante resonancia magnética nuclear. Una aplicación terapéutica preferida es, en el caso de una aplicación tópica, la prevención, el alivio y el tratamiento de la psoriasis, mientras que en el caso de una aplicación sistémica, la prevención, el alivio y el tratamiento de la regeneración del tejido conectivo en la restenosis.

Los compuestos de esta invención se pueden emplear como el único agente activo de la composición farmacéutica. De forma alternativa, se pueden usar en combinación con otros principios activos, por ejemplo otros principios farmacéuticos activos en el tratamiento de las anteriores patologías definidas.

Las concentraciones de los compuestos de la presente invención en la composición farmacéutica pueden variar. La concentración dependerá de factores tales como la dosificación total del fármaco que se va a administrar, las características químicas (por ejemplo, la hidrofobicidad) de los compuestos empleados, la ruta de administración, la edad, el peso corporal y los síntomas del paciente. Los compuestos de la presente invención se proporcionarán normalmente en una disolución de tampón fisiológico acuoso que contiene aproximadamente 0,1 a 10% p/v de compuesto para la administración parenteral. Los intervalos de dosis típicos son de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal por día; un intervalo de dosis preferido es de aproximadamente 0,01 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal por día, y preferentemente aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg una a cuatro veces al día. Una dosificación preferida del fármaco que se va a administrar dependerá probablemente de variables tales como el tipo y la extensión de la progresión de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente concreto, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado y la formulación del compuesto excipiente, y su ruta de administración.

Los derivados de K-252a preferidos incluyen compuestos modificados sintética y/o químicamente, por ejemplo, compuestos que tienen sustituyentes en el sistema de anillo, por ejemplo, grupos alquilo C₁-C₄, compuestos donde el grupo metil éster ha sido sustituido por otro grupo de éster, un grupo amida o por H o un catión y/o los compuestos, donde el átomo N en el grupo de amida cíclica está sustituido con un grupo alquilo C₁-C₄.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

La FIG. 1a y 1b representan gráficamente la estructura de los conjugados poliméricos de K-252a y sus derivados.

La FIG. 2 representa gráficamente la estructura del conjugado K-252a-PEG donde PEG está unido al fármaco por un enlace carbamato.

La FIG. 3 es un cromatograma de la purificación de un conjugado de PEG donde PEG está unido a K-252a por un enlace carbamato y la cadena de PEG tiene un peso molecular promedio de 2000 Da. En las inserciones, se muestran los espectros MALDI-TOF de los principales picos.

La FIG. 4a muestra los resultados de la concentración promedio en plasma de K-252a detectada en una fracción de plasma de ratones tras la administración tópica de K-252a.

La FIG. 4b es una gráfica que muestra el perfil de la concentración promedio en plasma frente al tiempo tras una única administración dérmica a una dosificación de aproximadamente 10 µmol/kg a 5,07 mg/kg, de K-252a.

La FIG. 5 muestra la actividad antiproliferativa en queratinocitos del compuesto conjugado K252a-PEG(2K) en el ensayo MTT tras 48 y 96 h de periodo de contacto.

La FIG. 6 muestra la actividad antiproliferativa en queratinocitos de K252a-PEG(2K) en el ensayo MTT. La FIG. 6a se refiere respectivamente a 1, 2 y 4 horas de periodo de contacto llevándose a cabo el recuento celular después de 48 h. La FIG. 6b se refiere respectivamente a 1, 2 y 4 h de periodo de contacto llevándose a cabo el recuento celular después de 96 h.

La FIG. 7 muestra la actividad antiproliferativa en queratinocitos de k252a en el ensayo MTT. La FIG. 7a se refiere respectivamente a 1, 2 y 4 horas de periodo de contacto llevándose a cabo el recuento celular después de 48 h. La FIG. 7b se refiere respectivamente a 1, 2 y 4 h de periodo de contacto llevándose a cabo el recuento celular después de 96 h.

La FIG. 8 es una gráfica que compara la actividad antiproliferativa en queratinocitos en el ensayo MTT de K252a y K252a-PEG(2K) tras 4 h de periodo de contacto y tras haber llevado a cabo el recuento celular después de 96 h.

La Fig. 9a y la Fig. 9b informan de la actividad inhibidora de K-252a y K-252a-PEG (2K), respectivamente, y notifican la comparación de la selectividad en la inhibición de la quinasa de K-252a-PEG(2K) frente a K-252a. Los datos notificados en la Fig. 10 están normalizados con respecto a la actividad de inhibición de TrkA.

La Fig. 11 muestra la CI_{50} de K-252a y K-252a-PEG(2K) frente a TrkA y la respectiva curva de inhibición.

La Fig. 12 muestra la inhibición de la secreción de $TNF-\alpha$ en el plasma de ratones tratados con K-252a-PEG(2K) antes de inducir la endotoxemia con una inyección de dosis de LPS en comparación con los ratones control que recibieron solo una disolución portadora antes del tratamiento con LPS en la Figura, las barras de error representan los datos de SEM analizados mediante un ANOVA bilateral seguido por los ensayos posteriores de Bonferroni.

Las Figuras 13a) a 13e) muestra la inhibición de la secreción de $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, MCP-1, MIP-1 y RANTES, respectivamente, en el plasma de ratones tratados con K-252a sin conjugar antes de inducir la endotoxemia con una inyección de una dosis de LPS en comparación con los ratones del control que recibieron solo una disolución portadora antes del tratamiento con LPS. En las figuras, el signo “§” indica fuera del intervalo de resultados.

Ejemplos

En los ejemplos siguientes, el producto identificado con los términos "K-252a-PEG", "K-252a-PEG(2K)" o "CT327" corresponde a un compuesto de acuerdo con la presente invención donde K-252a está conjugado con el grupo -OH del resto tetrahidrofurano con una cadena de PEG lineal de 2kDa mediante un enlace carbamato.

Ejemplo 1

Síntesis de un conjugado K-252a-PEG(2K) (compuesto CT327)

Se preparó una disolución de 1 mg/ ml de K-252a en diclorometano disolviendo 1,5 mg de K-252a (correspondiente a 3,208 mmol) en 1,5 ml de CH_2Cl_2 mediante agitación suave. La disolución se añadió a una matraz de vidrio que contenía 65,05 mg (32,525 mmol) de metoxi-PEG-isocianato 2K (m-PEG-isocianato con un peso molecular promedio de 2000 Da) y 100 ml de una disolución de 32,684 mg/ml de trietilamina en CH_2Cl_2 como catalizador básico. Tanto el polímero como el catalizador se utilizaron en una relación molar de 10 veces, comparado con K-252a. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente con agitación magnética (velocidad de agitación de aproximadamente 500 rpm) y un flujo suave de nitrógeno durante la noche (tiempo de reacción = 16h 40'). A continuación la disolución se evaporó y el residuo sólido se trató con 300 ml de DMSO. La mezcla se purificó mediante RP-HPLC en una columna C18 para obtener el producto deseado (pico correspondiente a un gradiente de aproximadamente 59/41 ACN/agua). Las fracciones correspondientes de cuatro procedimientos de purificación posteriores se combinaron y se secaron mediante evaporación del ACN y después se criodesecaron. Un análisis MALDI-TOF confirmó la identificación del producto con el conjugado K-252a-PEG (pico de masa polidisperso con un valor m/z máximo de 2468,81) [Fig. 2.3].

Ejemplo 2 Estudios farmacocinéticos in vivo

Ejemplo 2.1

Estudio de absorción cutánea en ratones de K-252a comparado con K-252a-PEG.

El presente estudio se ha llevado a cabo con el fin de medir y evaluar la cinética de absorción tras la administración cutánea de K-252a-PEG en ratones, comparado con la cinética de absorción de la molécula de K-252a no conjugada, es decir, no PEGilada. El experimento se llevó a cabo usando una dosis de principio activo en ambas preparaciones de 3 mg/kg. En el presente estudio se realizaron tres experimentos posteriores in vivo usando cada vez 6 ratones Balb/C macho adquiridos de Charles River (Calco, Italia). Los ratones se subdividieron en los siguientes grupos experimentales (dos animales por grupo):

- Grupo 1: Los ratones se trataron con 3 mg/kg de K-252a mediante administración cutánea y se sacrificaron después de 30 minutos.
- Grupo 2: Los ratones se trataron con 3 mg/kg de K-252a mediante administración cutánea y se sacrificaron después de 60 minutos.
- Grupo 3: Los ratones se trataron con 3 mg/kg de K-252a-PEG(2K) del Ejemplo 1 mediante administración cutánea y se sacrificaron después de 60 minutos.

Las formulaciones de K-252a y K-252a-PEG(2K) se prepararon respectivamente mediante la dilución de una disolución madre (disolución madre de K252a procedente de Calbiochem con número de lote B50496, disolución de 100µg/214 µl DMSO; la disolución madre de K-252a-PEG(2K) es una disolución de 0,226 mg de K252a/ ml DMSO) con aceite de oliva, hasta alcanzar una concentración final de K-252a de 0,3 mg/ ml de aceite de oliva/ DMSO 6%.

Las disoluciones se prepararon respectivamente de la siguiente forma: 60 µl de K-252a 5 mg/ ml DMSO + 940 µl de aceite de oliva y 30 µl K252a-PEG(2K), 5 mg/ ml DMSO + 470 µl de aceite de oliva. Las preparaciones de base oleosa están en forma de emulsiones que se han homogeneizado por sonicación repetida. En la espalda de cada animal (afeitado con una afeitadora eléctrica 72 horas antes del experimento) se aplicaron 240 µl de la disolución de K-252a y 235 µl de la disolución de K-252a-PEG (que corresponde a una dosis de 3 mg/kg basada en un peso corporal promedio del ratón de 23 - 24 g). La emulsión aplicada se masajeó suavemente en la espalda del ratón para favorecer la absorción. A continuación, los ratones se sacrificaron respectivamente a los 30 o 60 minutos con anestesia de éter, y se recogió la sangre de la aorta ventral con la jeringuilla de insulina (aprox. 1 ml/animal). La sangre se transfirió a continuación a un Eppendorf que contenía 50 µl de una disolución acuosa de EDTA al 5 %. A continuación, las muestras se centrifugaron a 2000 g durante 5 minutos en una centrífuga refrigerada (4 °C), se purificaron mediante extracción en fase sólida (SPE) y posteriormente se analizaron mediante análisis cuantitativo por HPLC (análisis RT- HPLC con una columna C18 XTerra, eluyente agua/ACN).

Las muestras de plasma del ratón tratado con K-252a mostraron una determinada concentración en plasma para ambos periodos de contacto. Los resultados se muestran en la Figura 4, de la cual se puede deducir que la concentración plasmática promedio de K-252a en los ratones del grupo 1, sacrificados a los 30 minutos, fue 23,33 ng/ ml, mientras que la concentración plasmática promedio de K-252a en los ratones del grupo 2, sacrificados a los 60 minutos, fue 42,11 ng/ ml. Esto demuestra la aparición de una adsorción sistémica tras administración cutánea de K-252a. Por otra parte, las muestras plasmáticas de los ratones tratados por administración cutánea del conjugado pegilado K-252a-PEG(2K) no mostraron ninguna concentración plasmática del compuesto activo, ni siquiera tras un periodo de contacto de 60 minutos. De hecho, no fue posible revelar ningún pico cromatográfico en las muestras plasmáticas de los ratones del grupo 3, incluso después del análisis MALDI-TOF. De este modo, no se observó adsorción a través de la piel del conjugado K-252a-PEG (2K) tras la administración cutánea.

Estos datos se han confirmado mediante estudios experimentales adicionales en un grupo mayor de animales ensayados, y también por administración cutánea de diferentes cantidades de dosis de los principios activos.

Ejemplo 2.2

Estudio farmacocinético (FC) en ratones: dosis cutánea única y administraciones repetidas de CT327 *versus* K-252a

El objetivo de este experimento era evaluar la cinética de adsorción de CT327 comparada con la de K-252a tras administración cutánea de los dos compuestos a ratones tras una única administración, así como la cinética comparativa de los dos compuestos de ensayo tras administraciones cutáneas repetidas.

- **Animales:** ratones (Balb/c macho, 7-9 semanas de edad, Charles River Italia, peso corporal promedio de 22,2-22,4 g); 5 grupos experimentales (control, administración única y repetida de K-252a, administración única y repetida de CT327), 4 animales/grupo, agrupados de forma aleatoria.
- **Materiales:** K-252a (Cephalon nº de lote 04274F1a), CT327 (Alchemy nº de lote ALC577.02), Dimetil sulfoxido (DMSO) Hybri-max® (Sigma nº de lote 114K2370), Vaselina blanca F.U. (AFOM Medical nº de lote A908006570), Tween 20 (Sigma nº de lote 092K0055), H₂O MilliQ, Plasma murino (cepa CD1,OF1 nº de lote 50-18/12/05, suministrado por Charles River Laboratories Italia SpA, Calco), Acetonitrilo (Merck nº de lote 1260430545), Metanol (VWR BDH nº de lote 05Z4034), EDTA (Fluka nº de lote 393230/1).
- **Dosis administrada:** K-252a 5,075 mg/kg y CT327 25,27 mg/kg (sobre la base de la pureza del 78,5%, es decir, 32,19 mg/kg, dosis equimolar con respecto a K-252a) para la administración cutánea única; K-252a 1,03 mg/kg y CT327 5,06 mg/kg (sobre la base de la pureza del 78,5%, es decir, 6,45 mg/kg, dosis equimolar con respecto a K-252a) para la administración cutánea repetida (una vez al día durante 5 días).
- **Administración de los elementos de ensayo:** Para administración cutánea, se esparcieron aproximadamente 0,25 g de crema de vaselina sobre el cuello de cada ratón (afeitado el día anterior a comenzar el experimento, evitando abrasión cutánea). Los animales de control recibieron el vehículo solo con el mismo volumen de dosis.
- **Formulación del artículo de ensayo:** DMSO al 1,1 %/crema de vaselina blanca para la administración cutánea única y DMSO 0,23%/ crema de vaselina blanca para la administración cutánea repetida.
- **Animal sacrificado y recogida de sangre:** Se recogieron muestras de sangre en los siguientes puntos temporales después del tratamiento:

- Administración cutánea única: 1, 3, 6, 9, 18, 24, 36, 48 y 72 horas después de la administración de K-252a o CT327
- Administración cutánea repetida: 3 y 24 horas después de la administración de K-252a y CT327, respectivamente.

En cada tiempo de muestreo se recogieron muestras de aproximadamente 0,4 ml de sangre de la aorta ventral de cada animal mediante una jeringa de insulina, bajo anestesia profunda de éter, y se transfirieron a tubos Eppendorf de polietileno que contenían 50 µl de una disolución de EDTA al 5 % para evitar la coagulación de la sangre. Las muestras de sangre se mantuvieron en hielo hasta centrifugación a 1400 g durante 5 min en una centrífuga refrigerada (2-4 °C). A continuación, se recuperaron muestras de plasma de cada tubo, se introdujeron en tubos

Eppendorf nuevos y se congelaron a -20 °C hasta su análisis por HPLC.

La Figura 4b muestra los resultados del estudio de administración de dosis única. Se muestra la curva de la concentración plasmática de K-252a tras la administración cutánea única de K-252a, notificados como valores promedio $\pm$ error (CI 95%, intervalo de confianza) (4 ratones para cada punto temporal, análisis por duplicado). En su lugar, no se detectó un perfil de concentración en plasma para la administración cutánea única de CT327. De hecho, el análisis de las muestras de plasma de los ratones que recibieron una administración cutánea única de CT327 en dosis equimolar en comparación con los ratones tratados con K-252, no reveló niveles de compuesto de ensayo superiores al límite de detección (70,6 nM) en cualquier punto temporal.

Se llevó a cabo el ajuste informático de los datos procedentes de cada grupo experimental mediante el programa NCOMP versión 3.1 (P.B. Laub y col., Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996, 85(4):393-395). Los valores del área bajo el perfil concentración-tiempo, $T_{1/2}$, T_{max} , C_{max} , etc. se calcularon mediante fórmulas convencionales anteriormente descritas (Gibaldi y col., Pharmacokinetics, 1982, Marcel Dekker, Inc., Nueva York). Estos parámetros FC estimados por ajuste de los datos de concentración plasmática de K-252a y CT327 se relacionan en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: Parámetros farmacocinéticos estimados en plasma de K-252a y CT327 tras administración cutánea única (10 μ mol/kg)

Parámetro FC	K 252a, derm.	CT327, derm.
$ABC_{0-\infty}$ (nM-min)	$2,85 \cdot 10^5$	ND
$T_{1/2}$ terminal (min)	63,13	ND
T_{max} (min)	180,00	ND
C_{max} (nM)	907,98	ND
Abreviaturas: $ABC_{0-\infty}$ (nM-min) = área bajo la curva desde tiempo cero hasta infinito, $T_{1/2}$ = semivida, C_{max} = nivel máximo en plasma, T_{max} = tiempo hasta el máximo nivel plasmático, ND = no detectado		

Los resultados de este estudio han confirmado que, tras una única administración cutánea, K-252a resulta detectable en plasma al menos hasta 9 horas después de la administración (con una semivida de 63 minutos), mientras que CT327 con un equivalente de dosis al de la dosificación de K-252-a, resultó indetectable en el plasma incluso después de un tiempo de contacto de 72 horas.

La Tabla 2 muestra los resultados del estudio de administración de dosis repetida. En particular, la Tabla 2 muestra los resultados del análisis mediante HPLC de niveles plasmáticos promedio para la administración repetida de K-252-a y CT327. Como se muestra, K-252a presenta una concentración plasmática que se puede detectar y cuantificar, mientras que, en los que respecta a CT327, no se reveló un nivel detectable de compuesto de ensayo en la sangre recogida tras las administraciones repetidas.

Tabla 2: Concentraciones promedio en plasma K-252a y CT327 tras una administración cutánea repetida (cada día durante 5 días) a una dosis de 1,03 mg/kg y 5,06 mg/kg respectivamente (aproximadamente 2 mmol/kg)

Elemento de ensayo y punto temporal	Concentración promedio en plasma (nM)	IC 95 %
K-252a, t = 3 h,	110,19	29,15
CT327, t = 24 h	No detectado	-

De este modo, en este segundo estudio, se evaluó la absorción tras una administración cutánea repetida (una vez al día durante 5 días consecutivos) a una dosis inferior (2 mmol/kg). Ni siquiera en este caso se detectó un pico cromatográfico correspondiente a la molécula CT327 PEGilada. Se escogió un punto temporal lo suficientemente prolongado para la extracción de sangre (24 h) para evidenciar una posible absorción muy lenta. Sin embargo, los presentes datos permiten concluir que no se produce absorción a través de la piel tras administración cutánea de K-252a-PEG (2K). En su lugar, en lo que respecta al compuesto K-252-a, el nivel plasmático de K-252a resultante después de 3 horas tras la última administración cutánea es de 110,2 nM, que incluso es un poco más elevada si se compara con la concentración encontrada para la misma dosis y punto temporal para una única administración cutánea (72,9 nM $\pm$ 32,5, como valor $\pm$ CI 95 %).

En conclusión, los resultados de los presentes estudios confirman la eficacia de la conjugación del polímero de K-252a para evitar la absorción sistémica de K-252a tanto después de una sola administración cutánea a dosis elevada o después de un tratamiento tópico de 5 días de duración a una dosis inferior.

Ejemplo 3. Farmacología in vitro

Ejemplo 3.1

- 5 Estudios in vitro para caracterizar la actividad antiproliferativa de K252a-PEG (2K) como inhibidor de Trka sobre queratinocitos humanos.

Se llevó a cabo un ensayo MTT como prueba de la vitalidad celular. El ensayo MTT se llevó a cabo usando un protocolo bien conocido y validado, donde los resultados se cuantifican mediante una lectura espectrofotométrica, siendo el número de células vivas directamente proporcional a la cantidad de producto formazano formado como producto de reacción de MTT (bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]) (Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 1983, 16 diciembre 65(1-2):55-63). En el presente estudio, ensayo MTT se llevó a cabo sobre cultivos subconfluentes de queratinocitos sembrados en placas de 96 pocillos para cultivo celular (8000 células/pocillo). Tras exponer las células a la sustancia que se desea analizar, las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C con MTT (0,05 %) en medio de crecimiento de queratinocitos exento de suero (KGM Clonetics Corp. San Diego, CA, EE.UU.). Tras la solubilización de las células con detergentes, se detectó la formación del colorante alimentario formazano usando un espectrofotómetro para placas multipocillo a 540 nm. Los resultados se proporcionan como unidad de densidad óptica (DO).

Se ensayó la actividad antiproliferativa del producto de conjugación K-252a-PEG(2K) con el ensayo MTT, para un tiempo de contacto entre los queratinocitos aislado en los pocillos con la disolución de compuesto a ensayar de 48 h y 96 h respectivamente, y para concentraciones de K-252a-PEG(2K) de 5, 10, 50 y 100 nM. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces. El análisis estadístico de los resultados del ensayo MTT se realizó con el modelo ANOVA (las barras de error representan el intervalo de confianza del 95%, $p = 0,05$). La Figura 5 muestra el resultado del ensayo MTT con K-252a-PEG(2K). Se demuestra claramente que K-252a-PEG muestra una acción inhibidora sobre los queratinocitos para concentraciones ≥ 10 nM tras 48 h de periodo de contacto, mientras que los efectos inhibitorios se demuestran para cualquier concentración tras un periodo de contacto de 96 h.

Estos resultados demuestran que la conjugación de K-252a con el polímero PEG no afecta la actividad antiproliferativa de la molécula activa K-252a (Figura 5). De hecho, tras un periodo de contacto de 48 h y 96 h, de demostró acción inhibidora sobre la proliferación de los queratinocitos.

Se llevó a cabo otro análisis mediante el ensayo MTT, por tanto, para probar que la ausencia o retraso en la absorción sistémica del K252a conjugado con PEG tras administración tópica (como se muestra en el ejemplo 2) y el retraso de la actividad inhibidora sobre la proliferación de queratinocitos, podría ser supuestamente el resultado de una entrada retardada del conjugado K-252a-PEG(2K) en el interior de la célula del queratinocito debido a la conjugación, es decir, la pegilación.

Por tanto, se realizó un ensayo adicional in vitro como se ha descrito anteriormente, usando tanto K-252 como K-252a-PEG(2K) como los compuestos a ensayar, para ensayar la actividad antiproliferativa de queratinocitos, donde se han reducido los tiempos de contacto entre el compuesto activo con los queratinocitos de los pocillos. La concentración de K252a y K-252a-PEG(2K) fue 25, 50 y 100 nM, respectivamente. Para cada concentración, los periodos de contacto fueron 1, 2 y 4 horas, respectivamente. El recuento celular se llevó a cabo transcurridas 48 horas y 96 horas.

Los resultados del ensayo MTT con K-252a-PEG(2K) se muestran en la Figura 6. Tanto después de 48 h como de 96 h, el efecto del compuesto conjugado K-252a-PEG(2K) sobre la proliferación de queratinocitos no parece diferir estadísticamente del efecto obtenido con la muestra de control (Figura 6a y Figura 6b).

Se llevó a cabo el mismo ensayo MTT con el K-252a no conjugado, mostrándose los resultados en la Figura 7a (recuento celular después de 48 h) y en la Figura 7b (recuento celular después de 96 h). Estos resultados han demostrado una acción antiproliferativa estadísticamente significativa de K-252a para cualquier tiempo de contacto a una concentración ≥ 200 nM y para un recuento celular después de 48 h. Cuando el recuento celular se realiza a la 96 h, se obtiene actividad antiproliferativa incluso para cualquier concentración y tiempo de contacto ensayados.

La Figura 8 muestra una comparación de los datos de la actividad inhibidora de 100 nM de K-252a y de K-252a-PEG(2K) respectivamente para el ensayo MTT anteriormente descrito con tiempos de contacto de 4 horas y un recuento celular realizado después de 96 h.

Estos resultados revelan que, de manera contraria al compuesto K-252a no conjugado, un tiempo de contacto de 4 horas no es suficiente para que K-252a-PEG(2K) evoluciones su acción antiproliferativa para concentraciones ≤ 100 nM (incluso cuando el recuento celular se realiza después de 96 h). En comparación con el compuesto no conjugado, es decir, K-252a no pegilado, para concentraciones inferiores de K-252a-PEG(2K) se necesita un periodo de contacto más prolongado para obtener el efecto de inhibición deseado sobre la actividad proliferativa de los queratinocitos. Para K-252a-PEG(2K), se ha demostrado por tanto un evidente retraso en su capacidad para

introducirse en la célula, y por tanto un retraso en atravesar la membrana celular, dando como resultado la pegilación de la molécula K-252a.

Esto parece confirmar adicionalmente la hipótesis de que el compuesto K-252a y sus derivados aprovechan su actividad tras la acumulación intracelular del compuesto K-252a y sus derivados y posteriormente muestra la liberación de las moléculas activas incluso después de la retirada del medio de cultivo.

Ejemplo 3.2

Evaluación *in vitro* del perfil inhibidor de quinasa de K-252a y CT327

Es bien sabido en la bibliografía que K-252a es un potente inhibidor de varias quinasas. En el presente estudio, se evaluó la actividad inhibidora de K-252a frente a tirosina quinasas y serina/treonina quinasas habituales seleccionadas. Se realizó un experimento similar para evaluar la actividad inhibidora de CT327.

K-252a (Acros lote A020265401) se disolvió en DMSO para preparar una disolución madre 1 mM que a continuación se diluyó con DMSO para obtener una disolución 20 μ M, que se diluyó adicionalmente en tampón de ensayo para conseguir una concentración de 0,8 μ M. K-252a se ensayó a una concentración de 200 nM. La preparación de CT327 y los compuestos de referencia se llevó a cabo según un procedimiento similar. CT327 también se ensayó a una concentración de 200 nM. Como compuestos de referencia, se utilizaron inhibidores de proteína quinasa bien conocidos en la técnica, tales como estaurosporina, 5-yodotubericidina, inhibidor II de JNK y B202190 (como se muestra en la Tabla 3).

Tabla 3: Compuestos de referencia

Compuestos de referencia	Concentración (nM)	Quinasas
Estaurosporina	0,3-10000	Tirosina quinasa Otras serina/treonina quinasas
5-yodotubericidina	10000	ERK1, ERK2
Inhibidor II de JNK	300	JNK1, JNK2,
SB202190	300	p38 α , p38 β

Los estudios de inhibición de quinasa para K-252a y C327 se llevaron a cabo mediante ensayos normalizados de la quinasa respectiva.

Los resultados de la inhibición de la tirosina quinasa y de la inhibición de la serina/treonina quinasas para K-252a se muestran en la Tabla a y b, respectivamente, y se han incluido en la Figura 9a. La actividad inhibidora de CT327 contra la tirosina quinasa y serina/treonina quinasas se muestra en la Tabla a y b, respectivamente, y se han incluido en la Figura 9b. El valor de lectura para la reacción de control (con ATP) se definió como 0 % de inhibición y el valor de lectura para el fondo (sin ATP) se definió como una inhibición del 100 %.

K-252a mostró, para una concentración de 200 nM, una actividad inhibidora muy fuerte superior al 90 %, frente a 16 de las quinasas ensayadas (TNK1, JAK2, JAK3, TYK2, FLT3, PDGFR α , PDGFR β , RET, TrkA, TrkB, TrkC, CHK1, CHK2, JNK1, JNK2, AurA y MAP2K3) y una fuerte inhibición comprendida entre 80% y 90% frente a otras 7 de las quinasas ensayadas (MER, JAK1, MET, KIT, BLK, FGR y CaMK2a).

Por el contrario, CT327 mostró a una concentración equivalente, en comparación con K-252a (200 nM), una fuerte actividad inhibidora (> 50 %) solamente frente a TrkA entre las tirosina quinasas ensayadas. Se mostró una baja actividad de CT327 contra JAK2, JAK3 y FLT3 (entre 20% y 30%), mientras que se observó una actividad muy baja para TNK1, EphB4, PDGFR β , BLK, LCK, TrkB y TrkC (entre 10% y 20%). No se observó ninguna inhibición para la mayoría de las tirosina quinasas ensayadas.

Dentro de las serina/treonina quinasas, CT327 mostró una fuerte actividad inhibidora (> 40%) solamente contra MAP2K3, muy baja (14%) contra JNK3 (destacada en verde) y ninguna actividad inhibidora contra el resto de serina/treonina quinasas ensayadas.

La Figura 10 notifica la comparación de la selectividad de CT327 **versus** K-252a. Los resultados muestran claramente una mejora drástica en la selectividad de la inhibición de quinasas de CT327 **versus** K-252a. En particular, los resultados demuestran un aumento en la selectividad de la actividad quinasa de CT327 con respecto a TrkA en el grupo de las tirosina quinasas y con respecto a MAP2K3 en el grupo de las serina/treonina quinasas.

Estos datos sugieren que la selectividad de inhibición de CT327 está dirigida en particular las dianas principales TrkA y MAP2K3, con la consiguiente disminución potencial de efectos biológicos indeseados como consecuencia de la actividad de inhibición contra otras quinasas. De este modo, cuantas menos quinasas adicionales se inhiban,

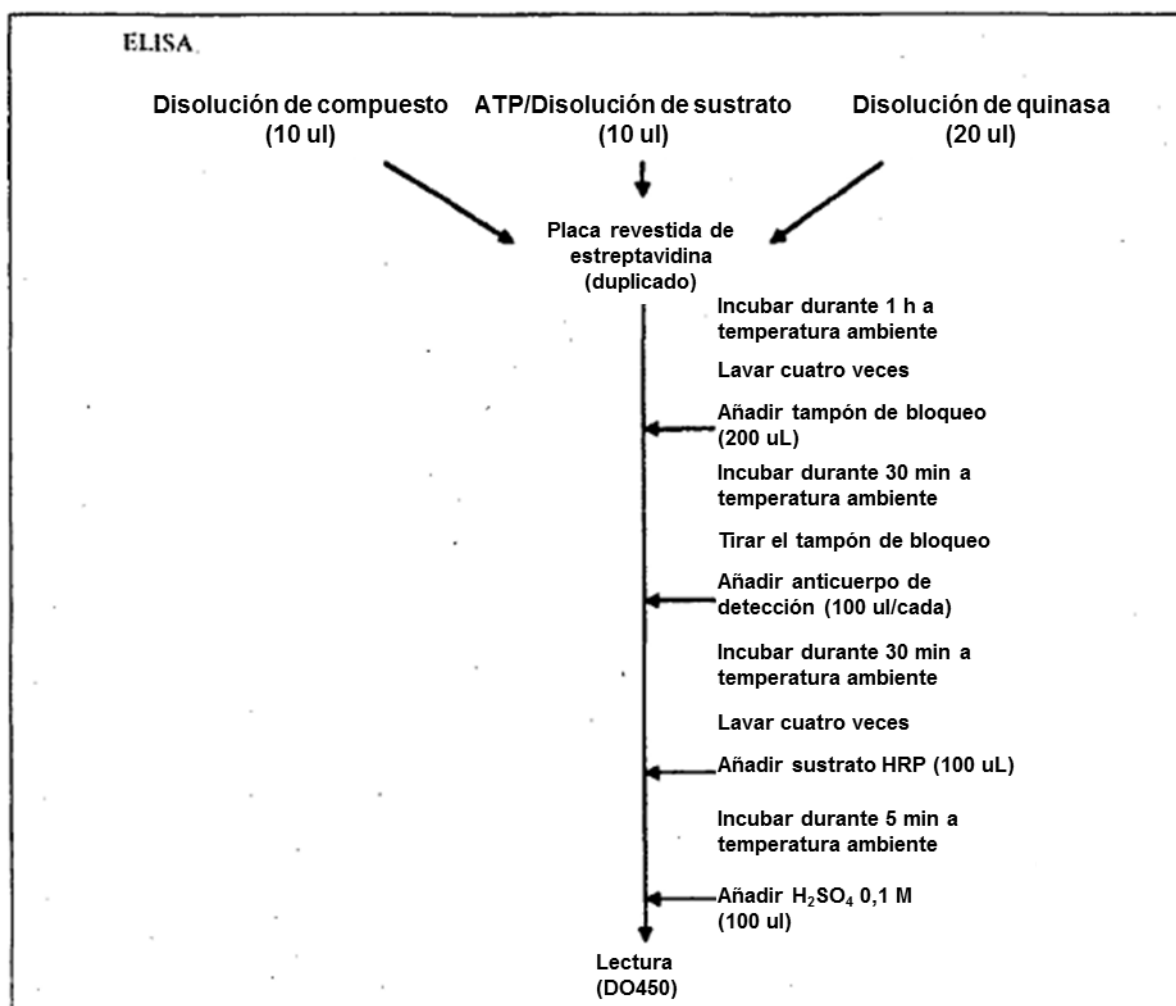
menos tóxica será la molécula.

En resumen, los resultados de los estudios descritos en los Ejemplos 2 y 3 convierten los conjugados poliméricos de K-252a de fórmula (I), y en particular el K-252a-PEG (2K), en candidatos prometedores como principios activos en un medicamento, debido a la actividad biológica intacta y el riesgo reducido paralelo de efectos adversos.

Ejemplos 3.3

Evaluación *in vitro* de la CI_{50} frente a TRKA para K-252a y CT327

El objetivo de este estudio era medir los valores de CI_{50} para CT327 y K-252a frente a la quinasa TrkA. Las disoluciones de compuesto de ensayo se diluyeron con DMSO para conseguir una concentración 100 veces inferior y a continuación se diluyeron 25 veces con tampón de ensayo (Tris-HCl 15 mM, pH 7,5, Tween-20 al 0,01 %, DTT 2 mM) para obtener las disoluciones de ensayo finales. CT327 y K-252a se ensayaron a las siguientes concentraciones: 1000 nM, 300 nM, 100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 0,3 nM, 0,1 nM, 0,03 nM. La preparación del compuesto de referencia (Estaurosporina) se llevó a cabo con un método similar al utilizado en preparación de los compuestos de ensayo. Estaurosporina se ensayó a las siguientes concentraciones: 100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 0,3 nM, 0,1 nM, 0,03 nM, 0,01 nM y 0,003 nM. El procedimiento de ensayo es el siguiente:



El valor de lectura para la reacción de control (con ATP) se definió como 0 % de inhibición, y el valor de lectura para el fondo (sin ATP) se definió como una inhibición del 100 %, a continuación, se calculó el porcentaje de inhibición para cada disolución de ensayo. Se calculó el valor de la CI_{50} a partir de las curvas de concentración **versus** % inhibición mediante ajuste a una curva logística de cuatro parámetros.

Los valores de la CI_{50} de K-252a y CT327 frente a TrkA fueron 0,50 nM y 186 nM, respectivamente. El correspondiente valor de la CI_{50} del compuesto de referencia (Estaurosporina) frente a TrkA fue 0,12 nM. Estos resultados se resumen en la Tabla 11.

Ejemplo 4

Estudio de toxicidad aguda de la monodosis en ratones para CT327 comparado con K-252a

- 5 El objetivo de este estudio era llevar a cabo un estudio de toxicidad no clínica para evaluar la toxicidad de CT327 cuando se administra como monodosis a ratones mediante la vía intraperitoneal y mediante administración por vía oral, comparada con la de su precursor K-252a. Un total de 70 ratones (Balb/c, 35 machos y 35 hembras) se dividieron en 14 subgrupos (7 grupos compuestos por 5 machos y 7 compuestos por 5 hembras) para recibir los siguientes niveles de dosis de los artículos de ensayo:

- 10 - K-252a: 30, 45, 60, 75, y 90 mg/kg
 - CT327: 316,68 y 475,02 mg/kg (correspondientes a 60 y 90 mg de K-252a, respectivamente).

15 Las observaciones, que incluyeron signos clínicos y cambios conductuales, se realizaron cada 30 minutos durante las 6 primeras horas después de la administración, y dos veces al día en los siguientes 7 días.

Entre los grupos de machos tratados con K-252a, solamente sobrevivieron los que recibieron la dosis más baja (30 mg/kg), mientras que el resto aparecieron muertos en las primeras 22 horas después de la dosificación. Por tanto, la DL_{50} fue 37,74 mg/kg.

20 Igualmente, las ratonas hembra que recibieron la dosis más baja de K-252a sobrevivieron y, al igual que los machos que recibieron la misma dosis, mostraron una sedación muy suave/suave que desapareció en 8-10 horas. Sobrevivió una hembra de las cinco que recibieron 45 mg/kg y una entre las que recibieron 60 mg/kg. Las dosis mayores de K-252a fueron letales para todos los ratones hembra. La DL_{50} para las hembras fue 41,44 mg/kg. El valor promedio de la DL_{50} para machos y hembras, conjuntamente, fue por tanto 39,02 mg/kg.

30 Dosis de CT327 iguales a 316,68 y 475,02 mg/kg mg/kg, correspondientes respectivamente a 60 y 90 mg/kg de K-252a, no introdujeron ningún signo conductual y/o clínico en ninguno de los grupos tratados, tanto en las horas inmediatamente posteriores a la dosificación o durante el periodo de observación de 7 días.

Se han obtenido resultados similares después de la administración oral. En particular, Se ha encontrado que la DL_{50} para K-252a era 78 mg/kg, mientras que no se observó mortalidad hasta la dosis máxima de 790 mg/kg de CT327.

Ejemplo 5

35 Se llevó a cabo un estudio con el fin de determinar cuantitativamente un panel de 24 citoquinas en el plasma de ratón en diferentes puntos temporales después de endotoxemia inducida por LPS y para comparar los perfiles obtenidos con aquellos ratones endotoxémicos pretratados con CT327.

Protocolo del estudio

40 Los animales se dividieron en dos grupos experimentales (55 ratones/grupo) que se trataron según la siguiente pauta:

	CONTROL (n = 55)	TRATADO (n = 55)
Tiempo: -15 minutos	Vehículo	CT-327 (105,56 mg/kg; ip)
Tiempo: 0	LPS (4 mg/kg; i.p.)	LPS (4 mg/kg; i.p.)

45 Inducción de endotoxemia: a tiempo 0 ambos grupos recibieron una dosis de LPS correspondiente a 4 mg/kg, i.p.

Tratamientos con CT327: los grupos experimentales "tratados" recibieron una única dosis de CT327 correspondiente a 105,56 mg/kg, i.p. Esta dosis se administró 15 minutos antes de la inducción de endotoxemia con LPS (tiempo 0). Al mismo tiempo, el grupo de "control" recibieron un volumen equivalente de disolución de vehículo.

Cada grupo experimental se dividió en 11 subgrupos con 5 ratones/subgrupo. Cada subgrupo se sacrificó en diferentes puntos temporales y se recogieron muestras de sangre.

55 Los puntos temporales en los que se recogió sangre fueron:

- Tiempo: tiempo 0 (inicial); antes del tratamiento con LPS
- Tiempo: + 30 minutos; después del tratamiento con LPS
- Tiempo: + 1 hora; después del tratamiento con LPS

- Tiempo: + 2 horas después del tratamiento con LPS
- Tiempo: + 3 horas después del tratamiento con LPS
- 5 • Tiempo: + 6 horas después del tratamiento con LPS
- Tiempo: + 12 horas después del tratamiento con LPS
- Tiempo: + 18 horas después del tratamiento con LPS
- 10 • Tiempo: + 24 horas después del tratamiento con LPS
- Tiempo: + 48 horas después del tratamiento con LPS
- 15 • Tiempo: + 72 horas después del tratamiento con LPS

Las muestras de sangre se recogieron en tubos con citrato de sodio (100 µl de citrato de sodio 0,1 M/900 µl de sangre) y se centrifugaron a 1000 g a 4°C durante 10 minutos. Las muestras de plasma se recogieron y 50 µl/muestra se congelaron a -80 °C hasta el ensayo para determinar los perfiles múltiples de las citoquinas. Las muestras se analizaron mediante el instrumento Bio-Plex System (Bio-Rad) de doble pistón utilizando un panel de 23-plete en el Departamento de Genética, Biología y Bioquímica, de la Universidad de Turín, dirigido por el Prof. Silengo. Se determinaron los niveles plasmáticos de las siguientes citoquinas: IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, KC, MIP-1-α; RANTES, TNF-α, IL-9, IL-13, eotaxina, MCP-1, MIP-1-α.

Los resultados más significativos se muestran en las Figuras 12 y13. En particular, la Figura 12 muestra la reducción significativa de la secreción de TNF-α en los niveles plasmáticos de ratones pretratados con el compuesto CT327 de acuerdo con la invención.

En su lugar, las Figuras 13 a-e muestran los resultados del experimento paralelo realizado con K-252a. Una reducción significativa no solamente en TNF-α, pero también sobre IFN-γ, MCP-1, MIP-α y RANTES.

Ejemplo 6

Síntesis de un K-252a-PEG(2K) (compuesto CT336)

1) Síntesis de m-PEG₁₁₀₀-O-CH₂-COOEt

En un matraz de reacción adecuado bajo una atmósfera inerte se añadió *t*-BuOK (11,2 g, 100,0 mmol) a THF anhidro (70,0 ml) a temperatura ambiente con agitación.

Cuando se completó la disolución, se añadió MeO-PEG₁₁₀₀-OH (22,0 g, 20,0 mmol) y a continuación se añadió BrCH₂CO₂Et (16,7 g, 100,0 mmol) gota a gota durante 30 min y el matraz de reacción se enfrió con un baño de agua.

Después de d2, el disolvente se eliminó a vacío a 40 °C.

El residuo obtenido (aproximadamente 65 g) se disolvió en H₂O (100 ml) y la disolución se extrajo rápidamente con CH₂Cl₂ (3 x 100 ml). La capa orgánica se volvió anhidra con (Na₂SO₄) y el disolvente se eliminó a vacío a 40 °C.

2) Síntesis de m-PEG₁₁₀₀-O-CH₂-COOH

El m-PEG-O-CH₂-COOEt (aproximadamente 20 g) bruto obtenido según se ha descrito anteriormente se disolvió en una disolución acuosa de NaOH (1 N, 200 ml) y se calentó a 60 °C durante 3 h con agitación.

A continuación, la mezcla de reacción se acidificó hasta pH 3 mediante una disolución acuosa de HCl (1 N, aproximadamente 165 ml) y a continuación se repartió con CH₂Cl₂ (5 x 100 ml). Los extractos orgánicos recogidos se volvieron anhidros (Na₂SO₄) y el disolvente se eliminó a vacío a 40 °C.

El aceite viscoso resultante (aproximadamente 18 g) se introdujo gota a gota en Et₂O anhidro frío (75 ml), y el precipitado blanco resultante se filtró, y se recogió, y el disolvente residual se evaporó a vacío a temperatura ambiente (15 g).

3) Síntesis de m-PEG₁₁₀₀-O-CH₂-NCO

En un matraz de reacción adecuado, m-PEG₁₁₀₀-O-CH₂-COOH (10,0 g, 9,1 mmol) se disolvió en tolueno (80 ml) con agitación. A continuación, se eliminaron por destilación aproximadamente 15 ml de disolvente para secar la mezcla mediante destilación azeotrópica.

El residuo se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron sucesivamente Et₃N anhidro (1,1 g, 10,9 mmol) y difenil fosforil azida [(C₆H₅O)₂P(O)N₃] (2,7 g, 10,0 mmol).

Después de 30 min a temperatura ambiente, la mezcla se calentó a temperatura de reflujo durante 2 horas, y a continuación el disolvente se evaporó a vacío a 60 °C.

El aceite viscoso resultante (*aproximadamente* 9 g) se introdujo gota a gota en Et₂O anhidro frío (200 ml), el precipitado blanco resultante se filtró, y se recogió, y el disolvente residual se eliminó a vacío a temperatura ambiente (6,0 g).

4) Síntesis de conjugados K-252a-PEG₁₁₀₀

Se preparó una disolución de 1 mg/ml de K-252a en DCM disolviendo 1,5 mg de K-252a (correspondiente a 3,2 mmol) en 1,5 ml de CH₂Cl₂ mediante agitación suave. La disolución se añadió a una matraz de vidrio que contenía 38,06 mg (32,5 mmol) de m-PEG₁₁₀₀-O-CH₂-NCO y 100 ml de una disolución de 32,8 mg/ ml de trietilamina en CH₂Cl₂ como catalizador básico. Tanto el polímero como el catalizador se utilizaron en una relación molar de 10 veces, comparado con K-252a. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente con agitación magnética (velocidad de agitación de aproximadamente 500 rpm) y un flujo suave de nitrógeno durante la noche (tiempo de reacción = 16h 40'). A continuación la disolución se evaporó y el residuo sólido se trató con 300 ml de DMSO. La mezcla se purificó mediante RP-HPLC en una columna C18 para obtener el producto deseado (pico correspondiente a un gradiente de aproximadamente 61/39 ACN/H₂O). Las fracciones correspondientes de cuatro procedimientos de purificación posteriores se combinaron y se secaron mediante evaporación del ACN y después se criodesecaron. Un análisis MALDI-TOF confirmó la identificación del producto con el conjugado K-252a-PEG₁₁₀₀.

Referencias

S P y col., "K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors", *Oncogene* 7:371-381, 1992

Di Marco E y col., "Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop", *J. Biol. Chem.* 268:22838-22846, 1993

Delsite R y col., "Anti-proliferative effect of the kinase inhibitor K252a on human prostatic carcinoma cell lines", *J. Androl.* 17:481-490, 1996

Reddy KR, "Controlled-release, pegilación, liposomal formulations: new mechanisms in the delivery of injectable drugs", *Ann. Pharmacother.* 34:915-923, 2000

Harris JM y col., "Effect of pegylation on pharmaceuticals", *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:214-221, 2003

Pepinsky RB y col., "Design, synthesis, and analysis of a polyethylene glycol-modified (PEGylated) small molecule inhibitor of integrin $\alpha\beta 1$ with improved pharmaceutical properties", *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312:742-750, 2005

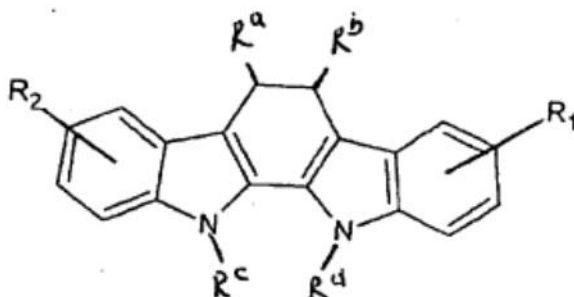
Yang H y col., "H MGB1 as a cytokine and therapeutic target", *J. Endotoxin Res.* 8:469-472, 2002

Wang H y col., "Extracellular role of H MGB1 in inflammation and sepsia", *J. Intern. Med.* 255:320-331, 2004

Lotze MT y col., "High-mobility group box 1. protein (H MGB1): nuclear weapon in the immune arsenal", *Nat. Rev. Immunol.* 5:331-342, 2005

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado polimérico de un compuesto de indolocarbazol de la fórmula general (I):



Fórmula (I)

donde R^a y R^b son de forma independiente un hidrógeno o un resto orgánico seleccionado entre el grupo que consiste en alquilo inferior sustituido o no sustituido, alqueniilo inferior sustituido o no sustituido, alquinilo inferior sustituido o no sustituido, hidroxilo, alcoxi inferior, carboxilo o alcocixarbonilo; o

R^a y R^b juntos forman una estructura cíclica de 5-7 miembros, preferentemente de 5 miembros condensada directamente con la estructura del núcleo de indolo[2,3-a]carbazol, que contiene 0, 1 o 2 heteroátomos, preferentemente átomos de nitrógeno, y que contiene opcionalmente un grupo carbonilo y estando la estructura cíclica no sustituida o sustituida por al menos un grupo sustituyente seleccionado a partir de un grupo carbonilo o W_1 o W_2 y donde si un miembro heteroátomo de la estructura cíclica es nitrógeno, el nitrógeno está sustituido por el resto R_3 ; y donde R^c y R^d son

(a) de forma independiente hidrógeno o un resto orgánico seleccionado entre el grupo que consiste de alquilo inferior sustituido o no sustituido, alqueniilo inferior sustituido o no sustituido, alquinilo inferior sustituido o no sustituido, hidroxilo, alcoxi inferior, carboxilo o alcocixarbonilo; o

uno de R^c y R^d se selecciona entre hidrógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido e hidroxilo, mientras que el otro uno de R^c y R^d es un resto cíclico de 3-7 miembros, donde el resto cíclico está no sustituido o sustituido por al menos un grupo funcional adecuado para la conjugación de un resto polimérico, o

(b) R^c y R^d juntos forman un resto cíclico de 3-7 miembros, donde el resto cíclico está no sustituido o sustituido por al menos un grupo funcional adecuado para la conjugación de un resto polimérico, y

donde R^1 y R^2 son restos iguales o diferentes y cada uno se selecciona de forma independiente entre el grupo que consiste en:

a) hidrógeno, halógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alqueniilo inferior sustituido o no sustituido, alquinilo inferior sustituido o no sustituido, hidroxilo, alcoxi inferior, carboxilo, alcocixarbonilo inferior, acilo, nitro, carbamoilo, alquilaminocarbonilo inferior, $-NR^5R^6$, donde R^5 y R^6 se seleccionan cada uno de forma independiente entre hidrógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alqueniilo inferior sustituido o no sustituido, alquinilo inferior sustituido o no sustituido, alquilo inferior sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, aralquilo sustituido o no sustituido, alquilaminocarbonilo sustituido o no sustituido, arilaminocarbonilo sustituido o no sustituido, alcocixarbonilo, carbamoilo, acilo o R^5 y R^6 se combinan con un átomo de nitrógeno procedente de un grupo heterocíclico,

b) $-CO(CH_2)_jR^4$, donde j es 1 a 6 y R^4 se selecciona entre el grupo que consiste en

(i) hidrógeno, halógeno, $-N_3$,

(ii) $-NR^5R^6$, donde R^5 y R^6 son tal como se ha definido anteriormente,

(iii) $-SR^7$, donde R^7 se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alqueniilo inferior sustituido o no sustituido, alquinilo inferior sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, aralquilo sustituido o no sustituido, $-(CH_2)_aCO_2R^{10}$, (donde a es 1 o 2, y donde R^{10} se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo inferior sustituido o no sustituido) y $-(CH_2)_aCO_2NR^5R^6$,

(iv) $-OR^8$, $-OCOR^8$, donde R^8 se selecciona entre hidrógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alqueniilo inferior sustituido o no sustituido, alquinilo inferior sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido

c) $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_j\text{R}^4$ donde j y R^4 son tal como se ha definido anteriormente;

d) $-(\text{CH}_2)_d\text{CHR}^{11}\text{CO}_2\text{R}^{12}$ o $-(\text{CH}_2)_d\text{CHR}^{11}\text{CONR}^5\text{R}^6$, donde d es 0 a 5, R^{11} es hidrógeno, $-\text{CONR}^5\text{R}^6$, o $-\text{CO}_2\text{R}^{13}$ (donde R^{13} es hidrógeno o un alquilo inferior sustituido o no sustituido) y R^{12} es hidrógeno o un alquilo inferior sustituido o no sustituido;

e) $-(\text{CH}_2)_k\text{R}^{14}$ es 2 a 6 y R^{14} es halógeno, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, $-\text{COOR}^{15}$, $-\text{OR}^{15}$, (donde R^{15} es hidrógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alquenilo inferior sustituido o no sustituido, alquinilo inferior sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido o acilo), $-\text{SR}^7$ (donde R^7 es tal como se ha definido anteriormente) $-\text{CONR}^5\text{R}^6$, $-\text{NR}^5\text{R}^6$ son tal como se ha definido anteriormente) o $-\text{N}_3$;

f) $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_m\text{R}^{16}$, donde m es 0 a 4, y R^{16} es hidrógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alquenilo inferior sustituido o no sustituido, alquinilo inferior sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, $-\text{COOR}^{15}$, $-\text{OR}^{15}$ (donde R^{15} es tal como se ha definido anteriormente) $-\text{CONR}^5\text{R}^6$ o $-\text{NR}^5\text{R}^6$ (donde R^5 y R^6 son tal como se ha definido anteriormente);

g) $-\text{CH}=\text{C}(\text{CO}_2\text{R}^{12})_2$ donde R^{12} es tal como se ha definido anteriormente;

h) $-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{16}$, donde n es 0 a 4 y R^{16} es tal como se ha definido anteriormente;

(i) $-\text{CH}_2\text{OR}^{22}$, donde R^{22} es trialquilo inferior en el que tres grupos de alquilo inferior son iguales o diferentes o donde R^{22} tiene el mismo significado que R^8 .

(j) $-\text{CH}(\text{SR}^{23})_2$ y $-\text{CH}_2\text{SR}^7$ donde R^{23} es alquilo inferior, alquenilo inferior o alquinilo inferior y donde R^7 es tal como se ha definido anteriormente, y

R^3 es hidrógeno, halógeno, acilo, carbamoilo, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo inferior sustituido o no sustituido o amino; y

W_1 y W_2 son, de forma independiente hidrógeno, hidroxilo o W_1 y W_2 juntos representan oxígeno; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables,

caracterizado por que el compuesto de fórmula (I) tiene al menos un grupo funcional con el que se conjuga un resto polimérico,

donde el al menos un grupo funcional al que se conjuga el resto polimérico se selecciona entre un grupo hidroxilo, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alcoxi inferior, carboxi, alcoxicarbonilo, amino, alquilamino inferior, alquilaminocarbonilo inferior y/u oxima y

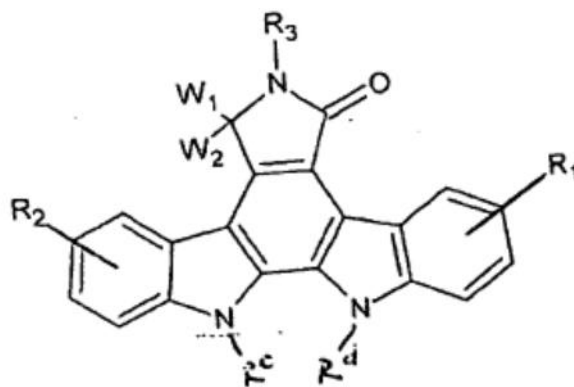
en el que el término "alquilo inferior" cuando se usa solo o en combinación con otros grupos se refiere a un grupo alquilo inferior lineal o ramificado que contiene entre 1-6 átomos de carbono,

el término "alquenilo inferior" se refiere a un grupo alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_6$ que puede ser de cadena lineal o ramificada y puede estar en la forma Z o E,

el término "alquinilo inferior" se refiere a un grupo alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_6$ que puede ser de cadena lineal o ramificada, y

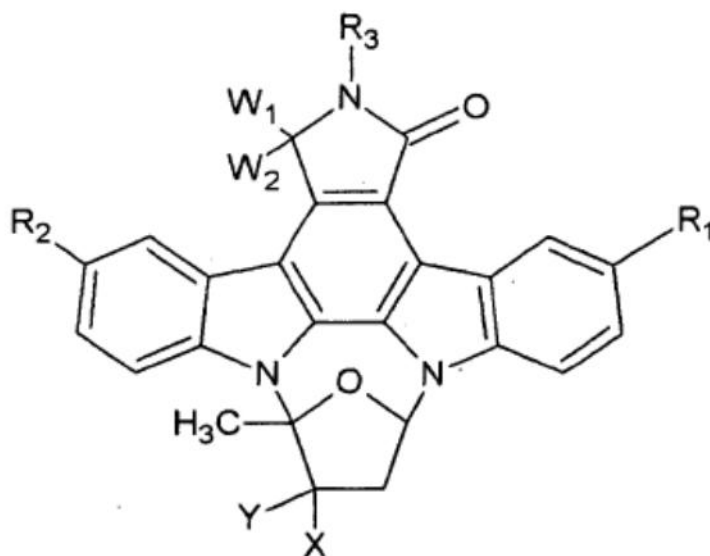
el término "alcoxi inferior" se refiere a un grupo alcoxi que contiene entre 1 y 6 átomos de carbono.

2. Un conjugado polimérico de la reivindicación 1, donde el compuesto de indolocarbazol de fórmula (I) es un compuesto de la fórmula general (II)



Fórmula (II)

3. Un conjugado polimérico de la reivindicación 1 o 2 representado por la siguiente fórmula (III):



Fórmula (III)

5 donde R₁, R₂, R₃ y W₁ y W₂ son tal como se define en la reivindicación 1, y donde
X representa -L¹-X' e Y representa -L²-Y', donde al menos uno de X' e Y' es un polímero, tanto lineal como
ramificado, que se une mediante L¹ y/o L² al resto de tetrahidrofurano del compuesto de fórmula (III); L¹ y/o L² son un
enlace químico covalente o un grupo enlazador;
cuando Y' es un polímero, y X' no es un polímero, L¹ es un enlace químico covalente y X' se selecciona entre el
grupo que consiste en

- (a) hidrógeno, hidroxialquilo inferior, acilo, carboxi, alcoxicarbonilo inferior,
(b) -CONR^{17a}R^{17b}, donde R^{17a} y R^{17b} se seleccionan cada uno de forma independiente entre

- (i) hidrógeno, alquilo inferior, alqueno inferior, alquino inferior,
(ii) -CH₂R¹⁸, donde R¹⁸ es hidroxilo, o
(iii) -NR¹⁹R²⁰, donde R¹⁹ o R²⁰ se seleccionan cada uno de forma independiente entre hidrógeno, alquilo
inferior, alqueno inferior, alquino inferior o R¹⁹ o R²⁰ son de forma independiente el resto de un α-
aminoácido en el que se excluye el grupo hidroxilo del grupo carboxilo, o R¹⁹ o R²⁰ se combinan con un átomo
de nitrógeno para formar un grupo heterocíclico; y

- (c) -CH=N-R²¹, donde R²¹ es hidroxilo, alcoxi inferior, amino, guanidino, o imidazolilamino;

cuando X' es un polímero, e Y' no es un polímero, L² es un enlace químico covalente e Y' se selecciona entre
hidroxilo, alcoxi inferior, aralquilo, o aciloxi;
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

4. El conjugado polimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el polímero es un polímero
seleccionado entre polialquilenglicol, óxido de polialqueno, ácido poliacrílico, poliacrilato, poliacrilamida o derivados
de N-alquilo de los mismos, ácido polimetacrílico, polimetacrilato, ácido polietilacrílico, polietilacrilato,
polivinilpirrolidona, poli (alcohol vinílico), ácido poliglicólico, ácido poliláctico, ácido poli (láctico-co-glicólico),
dextrano, quitosán o poliaminoácido.

5. El conjugado polimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el polímero es un polímero
seleccionado entre polietilenglicol (PEG) o metoxi-polietilenglicol (m-PEG).

6. El conjugado polimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el polímero es un polímero que tiene
un peso molecular de 100 a 100 000 da.

7. El conjugado polimérico de la reivindicación 5 o 6, donde el polímero es PEG o mPEG con un peso molecular
promedio de 2000 a 5000 Da.

8. El conjugado polimérico de la reivindicación 5 o 6 donde el polímero es PEG o mPEG con un peso molecular
promedio de 550 Da o 1100 Da.

9. El conjugado polimérico de cualquier reivindicación desde la 3 a la 8, donde el enlace químico entre el polímero y el compuesto de las fórmulas (I) o (II) o donde el L¹ y/o L² de fórmula (III) se selecciona entre un enlace carbamato, un enlace éter, un en enlace éster, un enlace de carbono, un enlace amida y/o un enlace amina.
- 5 10. El conjugado polimérico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, donde R₁, R₂, R₃, W₁, y W₂ son hidrógeno, Y' es un polímero y X' es metoxicarbonilo o carboxilo
- 10 11. El conjugado polimérico de la reivindicación 10, donde L² es un enlace éter o carbamato.
12. El conjugado polimérico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, donde R₁, R₂, W₁, y W₂ son hidrógeno, X' es un polímero e Y' es hidroxi.
- 15 13. El conjugado polimérico de la reivindicación 12, donde L¹ es un enlace amina o amida.
14. El conjugado polimérico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso como un agente activo en un medicamento.
- 20 15. El conjugado polimérico de la reivindicación 14 para uso como un agente activo en un medicamento tópico.
16. El conjugado polimérico de la reivindicación 14 para uso como un agente activo en un medicamento para tratamiento sistémico
- 25 17. La composición farmacéutica que comprende al menos un conjugado polimérico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, opcionalmente junto con portadores, adyuvantes, diluyentes o/y aditivos farmacéuticamente aceptables.
18. La composición farmacéutica de la reivindicación 17 para aplicación diagnóstica.
- 30 19. La composición farmacéutica de la reivindicación 17 para aplicación terapéutica.
20. Uso de un conjugado polimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para la fabricación de un medicamento para la prevención, el alivio o/y el tratamiento de patologías asociadas a HMGB1.
- 35 21. Uso de la reivindicación 20, donde las patologías asociadas a HMGB1 son estenosis, restenosis, aterosclerosis, artritis reumatoide, enfermedades autoinmunes, tumores, enfermedades infecciosas, sepsia, lesión pulmonar inflamatoria aguda, lupus eritematoso, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades del sistema nervioso central y periférico y esclerosis múltiple.
- 40 22. El uso de la reivindicación 21, donde la patología asociada a HMGB1 es estenosis o restenosis.
23. El uso de las reivindicaciones 20 a 22, donde el conjugado polimérico se inmoviliza de forma reversible sobre la superficie del dispositivo médico.
- 45 24. Uso de un conjugado polimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para la fabricación de un medicamento para la prevención, el alivio y/o el tratamiento de trastornos neurológicos, neuropatías y trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso central y periférico.
- 50 25. Uso de un conjugado polimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para la fabricación de un medicamento para la prevención, el alivio, o/y el tratamiento de patologías cutáneas.
26. Uso de la reivindicación 25, donde las patologías cutáneas se **caracterizan por** la hiperproliferación de los queratinocitos.
- 55 27. Uso de la reivindicación 25 o la reivindicación 26, donde las patologías cutáneas son psoriasis, dermatitis atópica, eczema crónico, acné, psoriasis, pitiriasis rubra pilaris, queloides, cicatrices hipertróficas y tumores de la piel.
28. Uso de la reivindicación 27, donde la patología cutánea es psoriasis.
- 60 29. Uso de un conjugado polimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para la fabricación de un medicamento para la prevención, el alivio, o/y el tratamiento del dolor y la hiperalgesia relacionados con NGF.
- 65 30. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, donde el medicamento se prepara para su administración tópica.

31. Uso de la reivindicación 30, donde la administración se hace en forma de liposomas.

32. Uso de un conjugado polimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para la fabricación de un medicamento para la prevención, el alivio y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, lesión por reperfusión tras trasplante de órgano, afecciones cardiovasculares, enfermedades obstétricas y ginecológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades alérgicas y atópicas, patologías de tumores sólidos y líquidos, enfermedades de rechazo al trasplante, enfermedades congénitas, enfermedades dermatológicas, enfermedades neurológicas, caquexia, enfermedades renales, dolencias por intoxicación iatrogénica, enfermedades metabólicas e idiopáticas, y enfermedades oftalmológicas.

10 33. Uso de un conjugado polimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para la fabricación de un medicamento para la prevención, el alivio y/o el tratamiento de la enfermedad de Behçet, el síndrome de Sjögren, vasculitis, uveítis, retinopatías.

15 34. Uso de las reivindicaciones 29, 32 o 33 donde el medicamento es para la administración sistémica.

Figura 1a

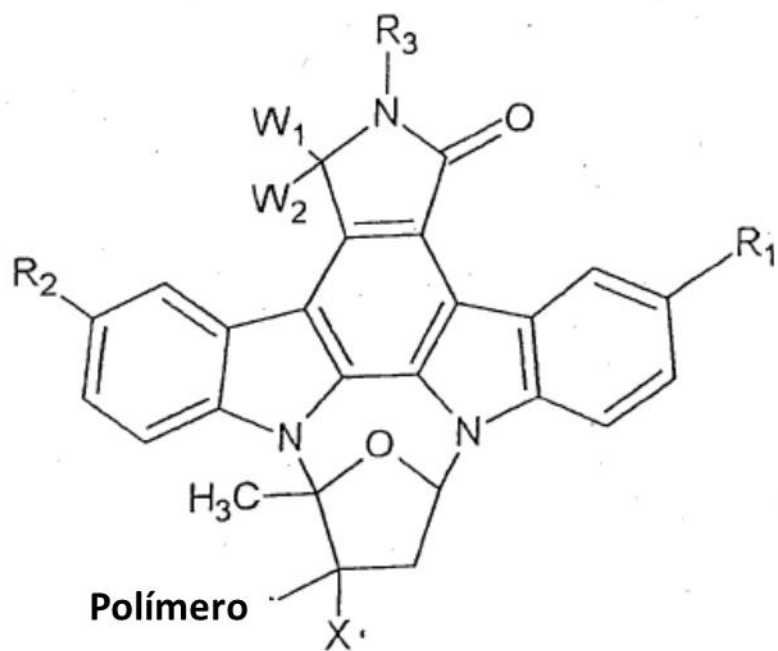


Figura 1b

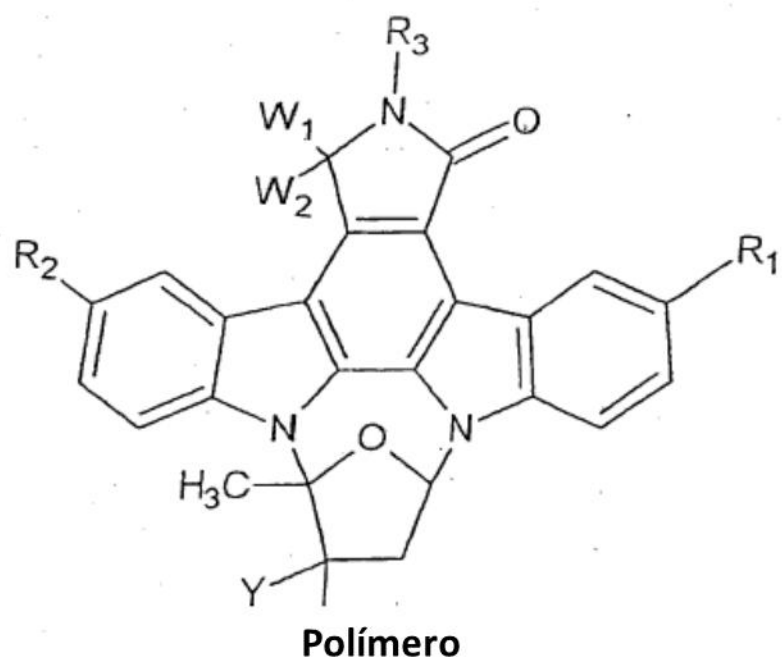


Figura 2

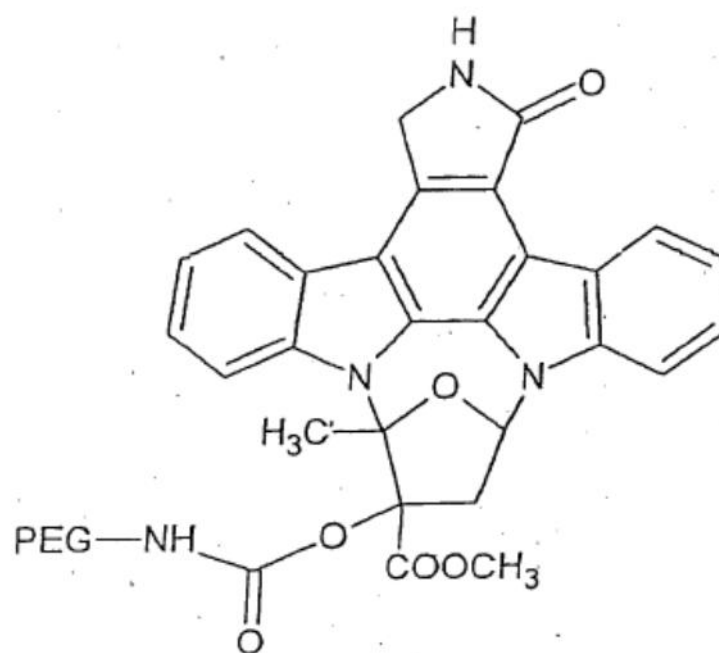


Figura 3

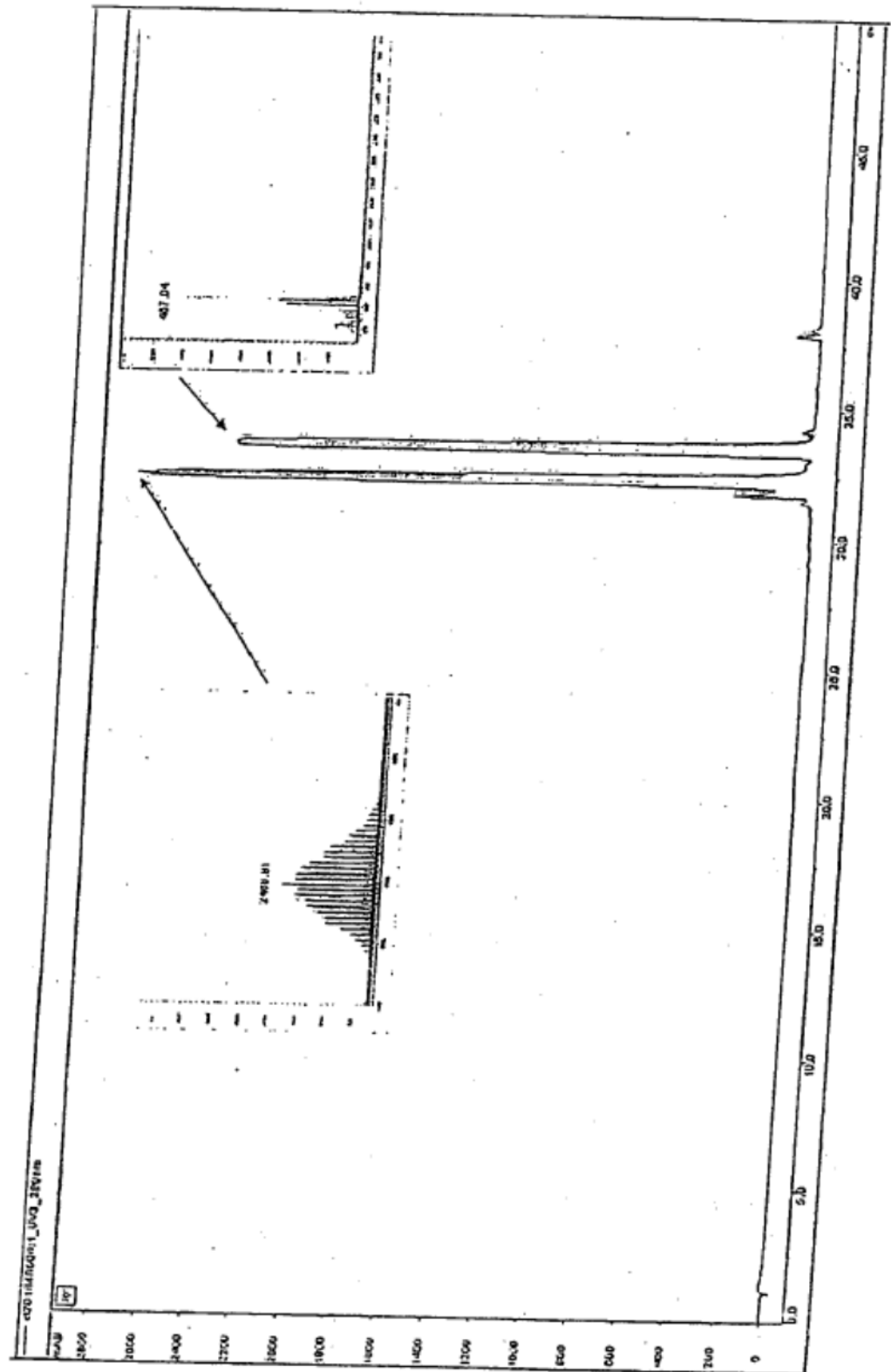


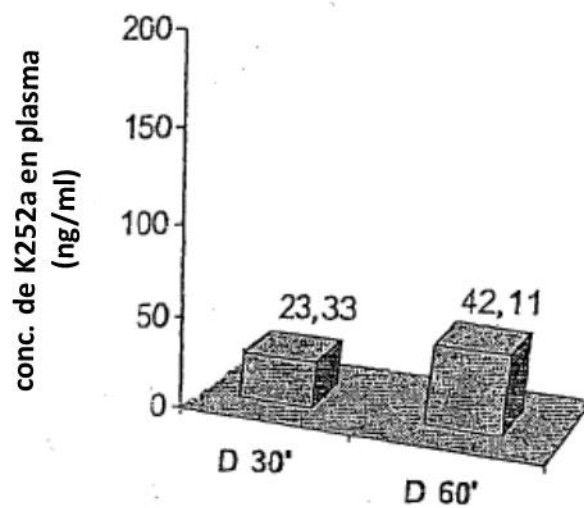
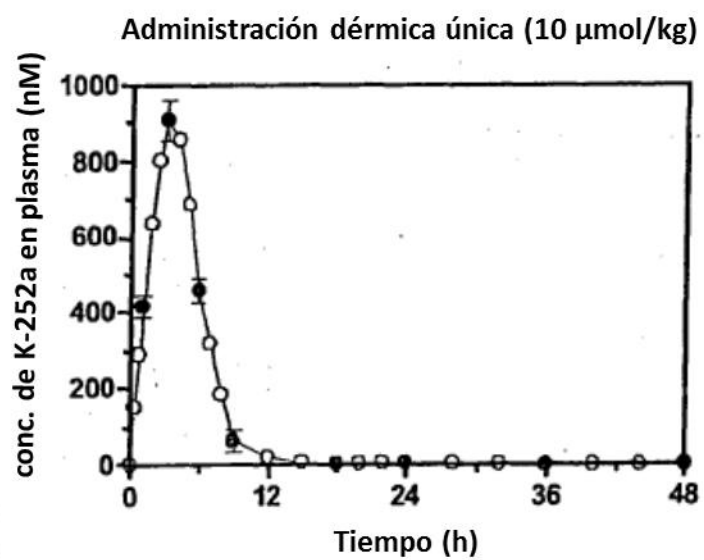
Figura 4a**Figura 4b**

Figura 5

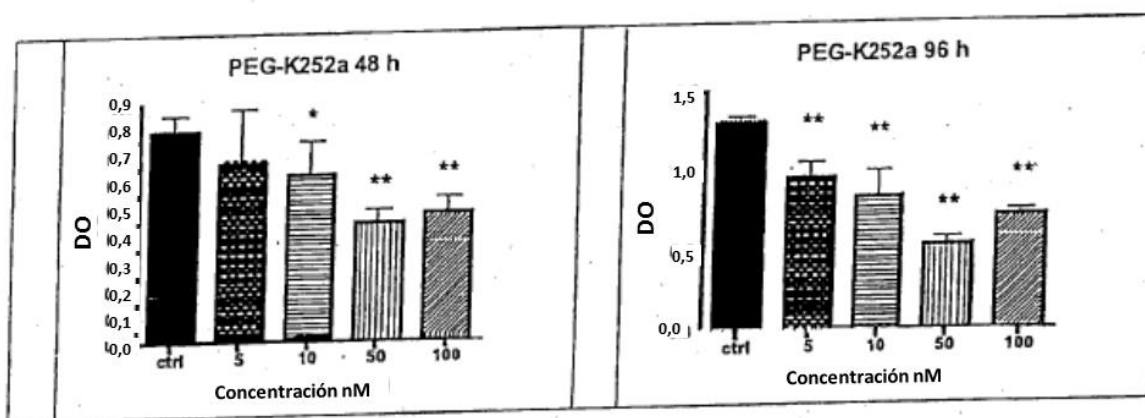


Figura 6

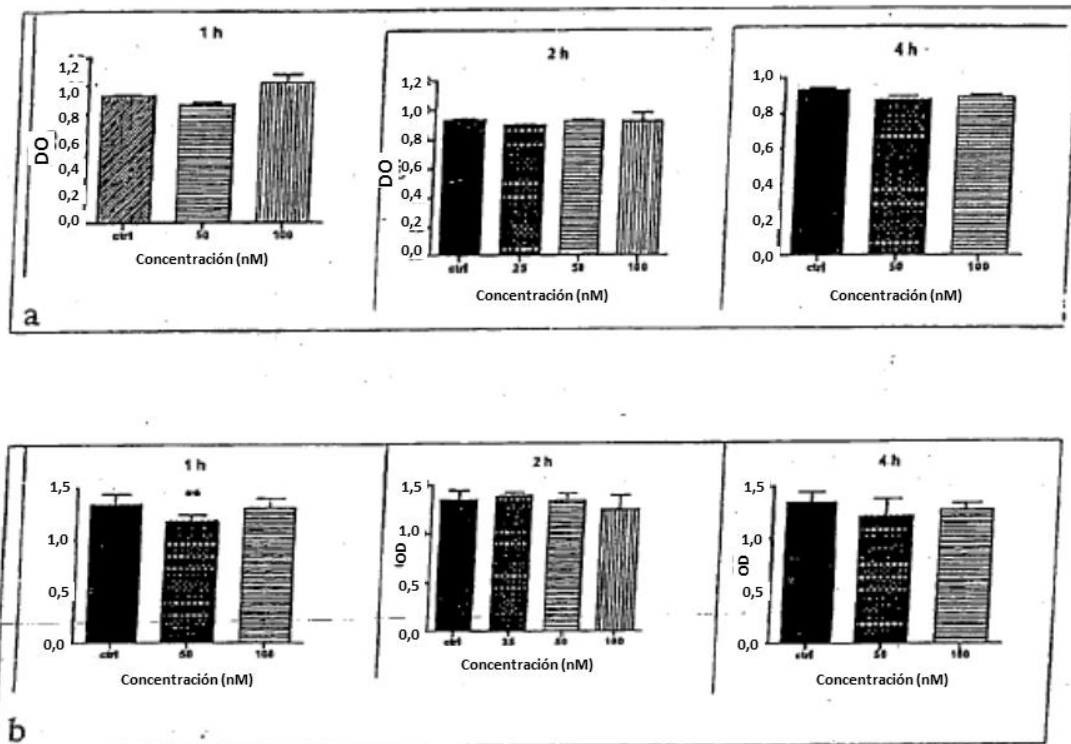


Figura 7

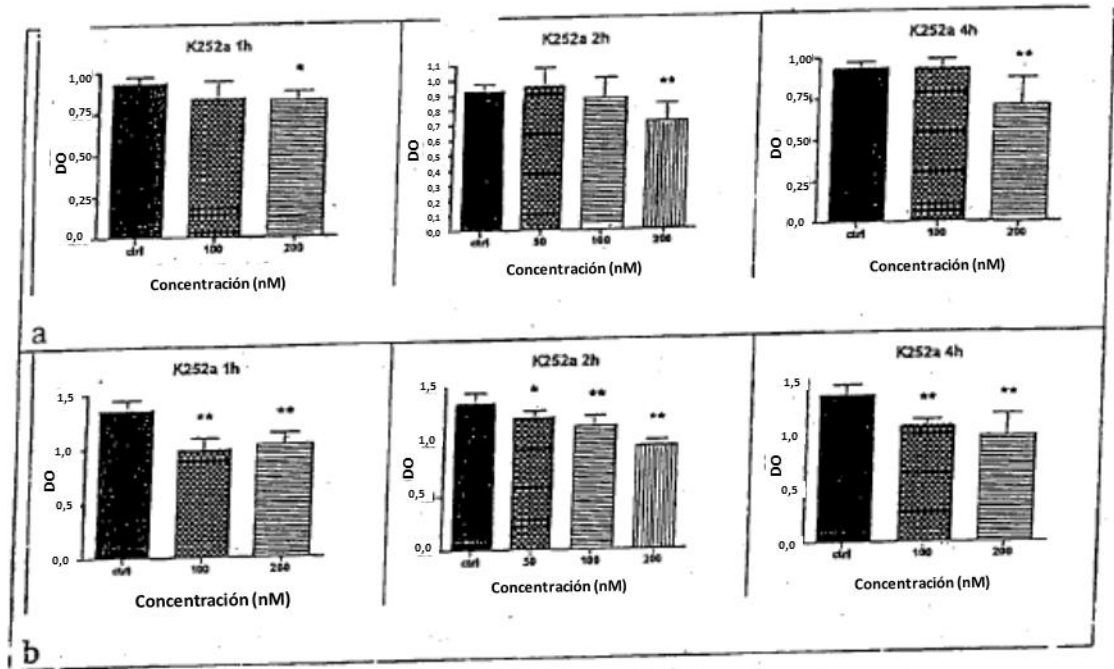


Figura 8

Tiempo de contacto: 4 h - Conc.: 100 nM - MTT 96 h

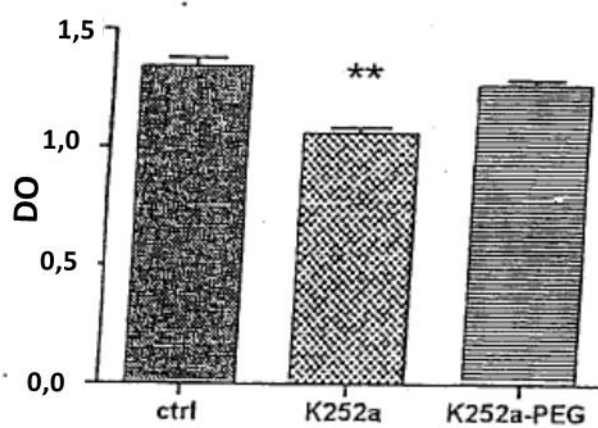


Figura 9a

Tabla a: Inhibición de la tirosina quinasa por K-252a

<i>Quinasa</i>	<i>K-252a (200 nM)</i>	<i>Ref</i>	<i>Ref. cpd (nM)</i>
ABL	-14,2	86,2	Estaurosporina (1000)
ARG	0,1	89,6	Estaurosporina (3000)
TNK1	94,8	89,2	Estaurosporina (3)
ALK	69,5	93,8	Estaurosporina (30)
AXL	51,5	85,1	Estaurosporina (3000)
MER	80,8	90,7	Estaurosporina (100)
CSK	43,0	88,8	Estaurosporina (300)
EGFR	16,4	91,4	Estaurosporina (10000)
HER2	7,7	65,6	Estaurosporina (10000)
HER4	39,4	94,1	Estaurosporina (10000)
EphA2	8,9	93,7	Estaurosporina (10000)
EphB2	0,4	83,7	Estaurosporina (1000)
EphB4	13,3	92,7	Estaurosporina (10000)
FAK •	53,5	90,4	Estaurosporina (100)
FGFR1	57,9	91,4	Estaurosporina (100)
FGFR2	67,2	96,7	Estaurosporina (100)
IGF1R	40,6	98,6	Estaurosporina (3000)
INSR	38,0	93,3	Estaurosporina (1000)
JAK1	83,1	82,8	Estaurosporina (30)
JAK2	99,5	96,3	Estaurosporina (3)
JAK3	100,4	97,8	Estaurosporina (3)
TYK2	98,1	94,5	Estaurosporina (3)
MET	83,2	87,0	Estaurosporina (300)
RON	5,2	81,6	Estaurosporina (10000)
FLT3	95,8	94,0	Estaurosporina (3)
CSFR	55,7	89,1	Estaurosporina (30)
KIT	87,3	96,7	Estaurosporina (10)
PDGFRa	96,1	93,5	Estaurosporina (3)
PDGFR6	98,1	98,7	Estaurosporina (0,3)
RET	94,2	88,1	Estaurosporina (30)

Figura 9a (continuación)

<i>Quinasa</i>	<i>K-252a (200 nM)</i>	<i>Ref</i>	<i>Ref. cpd (nM)</i>
BLK	83,5	94,9	Estaurosporina (30)
BRK	35,8	87,4	Estaurosporina (10000)
FGR	85,6	88,7	Estaurosporina (10)
FYN	67,2	98,9	Estaurosporina (100)
HCK	68,2	96,1	Estaurosporina (30)
LCK	65,2	97,6	Estaurosporina (100)
LYNa	58,9	95,2	Estaurosporina (100)
LYNb	51,2	96,4	Estaurosporina (100)
SRC	20,6	90,0	Estaurosporina (3000)
SRM	0,4	74,0	Estaurosporina (10000)
YES	65,1	94,1	Estaurosporina (30)
TrkA	97,6	93,4	Estaurosporina (3)
TrkB	98,2	67,3	Estaurosporina (0,3)
TrkC	94,4	86,2	Estaurosporina (10)
FLT1	73,9	94,8	Estaurosporina (300)
KDR	62,9	87,7	Estaurosporina (300)

Tabla b: Inhibición de la Serina/treonina quinasa por K-252^a

<i>Quinasa</i>	<i>K-252a (200 nM)</i>	<i>Ref</i>	<i>Ref. cpd (nM)</i>
PKACa	69,4	94,9	Estaurosporina (30)
PKCa	64,4	97,8	Estaurosporina (30)
PKCt	60,9	98,8	Estaurosporina (3)
PKCy	53,3	94,3	Estaurosporina (10)
CaMK4	0,0	88,4	Estaurosporina (3000)
CaMK2a	83,9	92,9	Estaurosporina (30)
CHK1-	92,8	91,1	Estaurosporina (10)
MAPKAPK2	44,3	90,5	Estaurosporina (1000)
CHK2	93,9	97,1	Estaurosporina (300)
CDK/CycA	75,5	95,7	Estaurosporina (30)

Figura 9a (continuación)

Quinasa	K-252a (200 nM)	Ref	Ref. cpd (nM)
Erk1	32,0	80,2	5-yodotubericidina (10000)
Erk2	14,2	62,1	5-yodotubericidina (10000)
JNK1	94,3	82,1	Inhibidor de JNK II (300)
JNK2	91,4	92,8	Inhibidor de JNK II (300)
p38a	-1,5	87,9	SB202190 (300)
p3813	-0,2	55,7	SB202190 (300)
AurA	91,9	84,9	Estaurosporina (30)
IKKB	2,7	47,9	Estaurosporina (10000)
MAP2K3	100,0	84,5	Estaurosporina (30)
MAP2K7	68,2	85,8	Estaurosporina (3000)
IRAK4	51,9	95,9	Estaurosporina (10000)

Figura 9b

Tabla a: Inhibición de la tirosina quinasa por CT327

<i>Quinasa</i>	<i>CT327 (200 nM)</i>	<i>Ref</i>	<i>Ref. cpd (nM)</i>
ABL	2,2	89,3	Estaurosporina (1000)
ARG	1,6	90,7	Estaurosporina (3000)
TNK1	13,0	84,0	Estaurosporina (3)
ALK	9,5	93,9	Estaurosporina (30)
AXL	-2,2	90,3	Estaurosporina (3000)
MER	-0,1	84,2	Estaurosporina (100)
CSK	1,0	91,0	Estaurosporina (300)
EGFR	2,9	85,3	Estaurosporina (10000)
HER2	-1,4	37,8	Estaurosporina (10000)
HER4	5,3	88,2	Estaurosporina (10000)
EphA2	-4,8	87,7	Estaurosporina (10000)
EphB2	-2,9	83,6	Estaurosporina (1000)
EphB4	15,1	83,5	Estaurosporina (10000)
FAK	3,8	84,5	Estaurosporina (100)
FGFR1	1,0	90,0	Estaurosporina (100)
FGFR2	6,0	95,8	Estaurosporina (100)
IGF1R	4,5	90,4	Estaurosporina (3000)
1NSR	3,0	92,8	Estaurosporina (1000)
JAK1	3,1	90,8	Estaurosporina (30)
JAK2	30,9	96,0	Estaurosporina (3)
JAK3	27,1	86,7	Estaurosporina (3)
TYK2	16,2	90,4	Estaurosporina (3)
MET	6,2	73,8	Estaurosporina (300)
RON	-0,7	69,1	Estaurosporina (10000)
FLT3	24,7	85,9	Estaurosporina (3)
CSFR	-5,7	87,8	Estaurosporina (30)
KIT	-3,3	96,7	Estaurosporina (10)
PDGFR α	7,7	91,6	Estaurosporina (3)
PDGFRβ	13,9	80,9	Estaurosporina (0,3)
RET	8,0	88,9	Estaurosporina (30)

Figura 9b (continuación)

Quinasa	CT327 (200 nM)	Ref	Ref. cpd (nM)
BLK	11,1	94,1	Estaurosporina (30)
BRK	-5,4	71,3	Estaurosporina (10000)
FGR	-0,2	85,3	Estaurosporina (10)
FYN	-5,1	95,6	Estaurosporina (100)
HCK	-3,1	90,2	Estaurosporina (30)
LCK	15,9	96,5	Estaurosporina (100)
LYNa	6,9	94,8	Estaurosporina (100)
LYNb	2,2	93,0	Estaurosporina (100)
SRC	4,7	86,7	Estaurosporina (3000)
SRM	-0,8	61,4	Estaurosporina (10000)
YES	5,0	85,8	Estaurosporina (30)
TrkA	55,0	88,0	Estaurosporina (3)
TrkB	11,6	46,1	Estaurosporina (0,3)
TrkC	16,3	86,3	Estaurosporina (10)
FLT1	3,9	94,6	Estaurosporina (300)
KDR	7,5	90,8	Estaurosporina (300)

Tabla b: Inhibición de la Serina/treonina quinasa por CT327

Quinasa	CT327 (200 nM)	Ref	Ref. cpd (nM)
AKT2	0,9	90,7 ,	Estaurosporina (1000)
PKACa	-1,8	93,8	Estaurosporina (30)
PKCa	-2,0	96,1	Estaurosporina (30)
PKCE	0,7	102,1	Estaurosporina (3)
PKCy	-2,1	94,3	Estaurosporina (10)
CaMK4 ,	0,5	87,9	Estaurosporina (3000)
Ca M K2a	0,9,	96,1	Estaurosporina (30)
CHK1	4,8	93,5	Estaurosporina (10)
MAPKAPK2	-0,3	81,6	Estaurosporina (1000)
CHK2	3,0	98,1	Estaurosporina (300)

Figura 9b (continuación)

Quinasa	CT327 (200 nM)	Ref	Ref. cpd (nM)
CDK/CycA	-7,8	95,0	Estaurosporina (30)
Erk1	-4,2	76,9	5-yodotubericidina (10000)
Erk2	3,6	67,5	5-yodotubericidina (10000)
JNK1	3,9	55,3	Inhibidor de JNK II (300)
JNK2	4,0	90,8	Inhibidor de JNK II (300)
JNK3	14,7	89,7	Inhibidor de JNK II (1000)
p38a	-1,9	92,3	SB202190 (300)
p380	4,4	81,1	SB202190 (300)
AurA	-1,1	85,5	Estaurosporina (30)
IKKB	-2,7	53,8	Estaurosporina (10000)
MAP2K1	6,1	65,0	Estaurosporina (3)
MAP2K3	40,7	78,0	Estaurosporina (100)
MAP2K7	8,5	92,5	Estaurosporina (300)
IRAK4	-11,1	98,6	Estaurosporina (10000)

Perfiles de inhibición de quinasas para K2552a y CT327

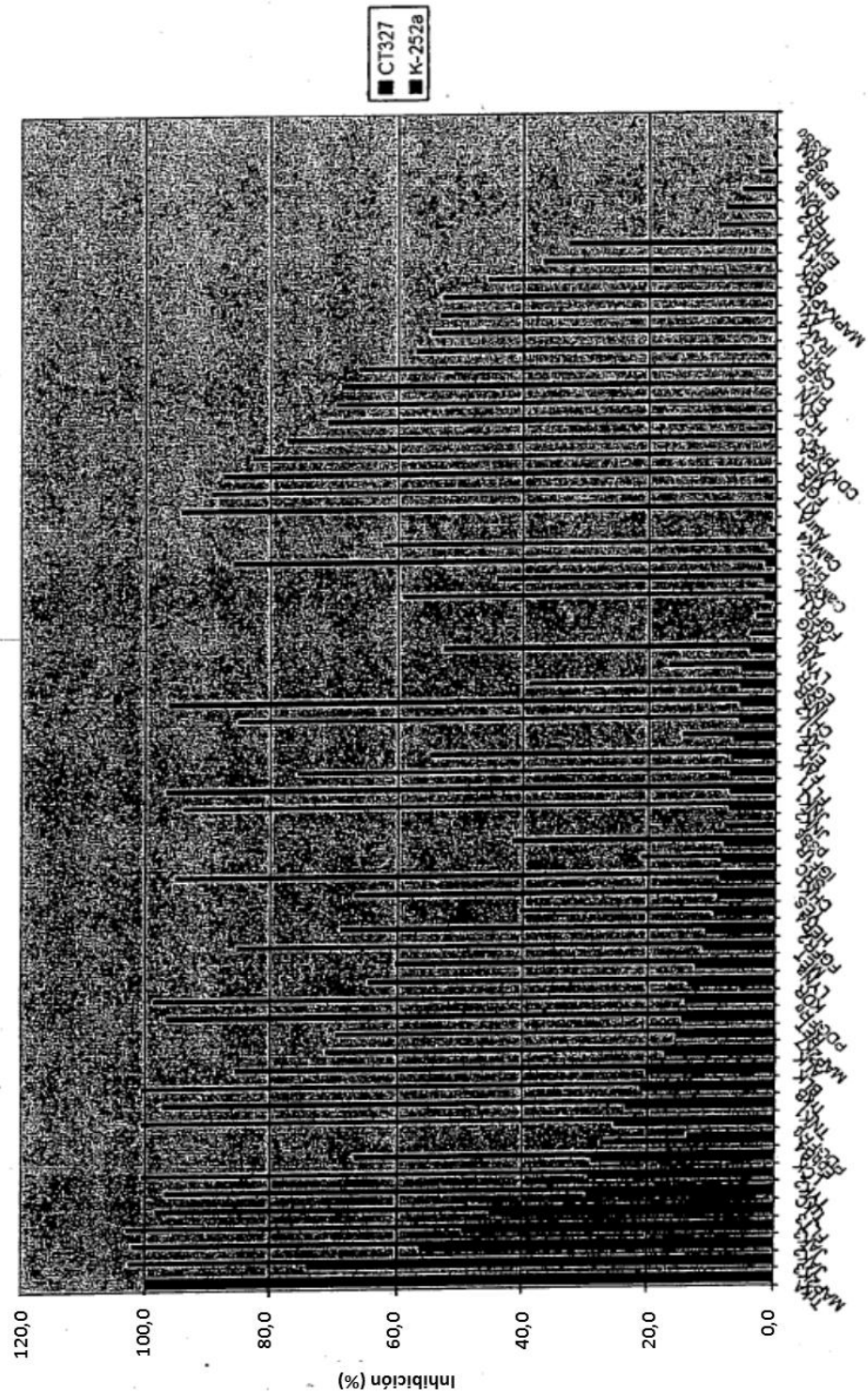


Figura 10

Figura 11

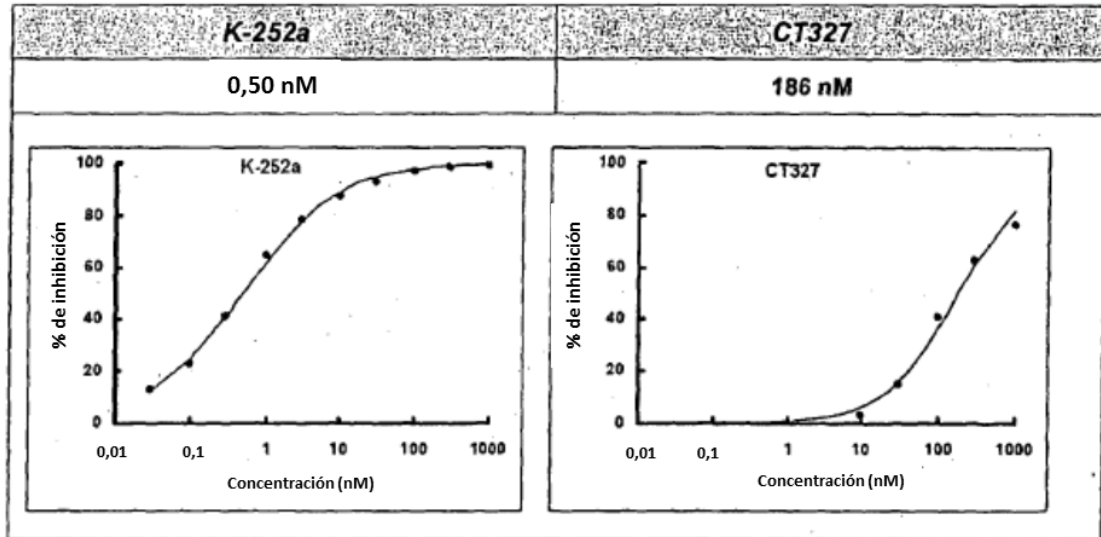
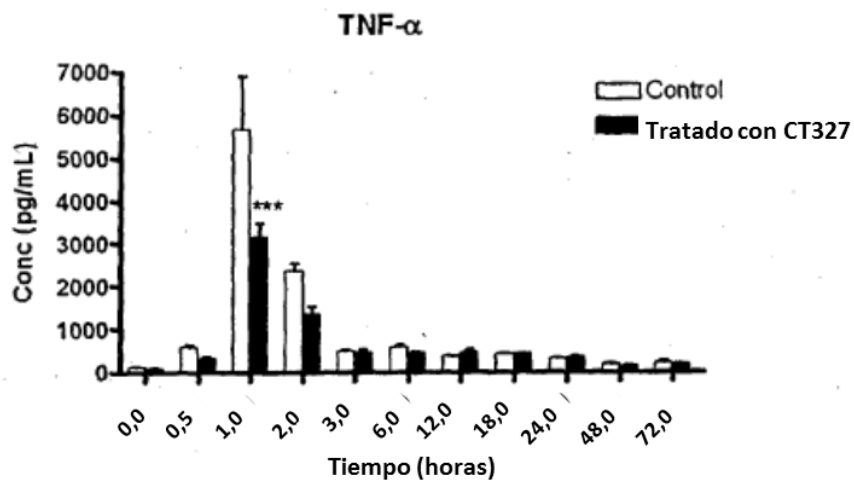
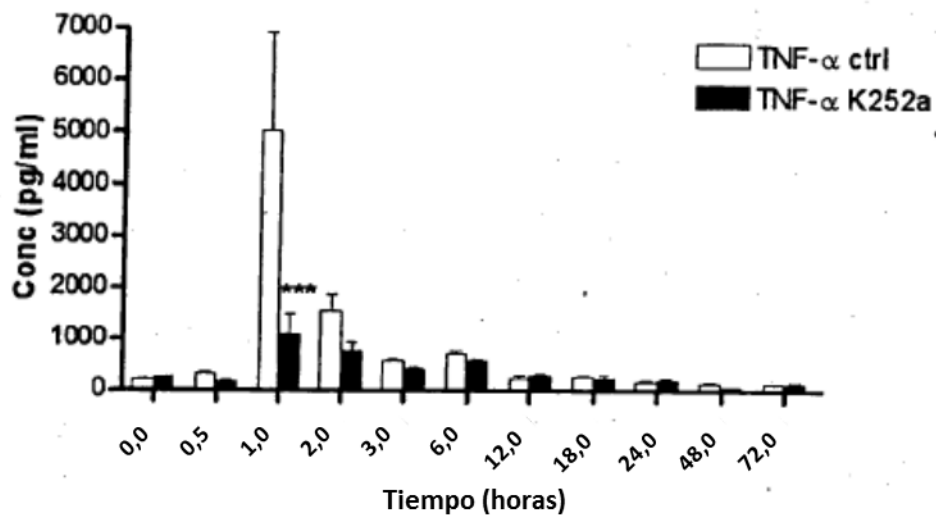


Figura 12



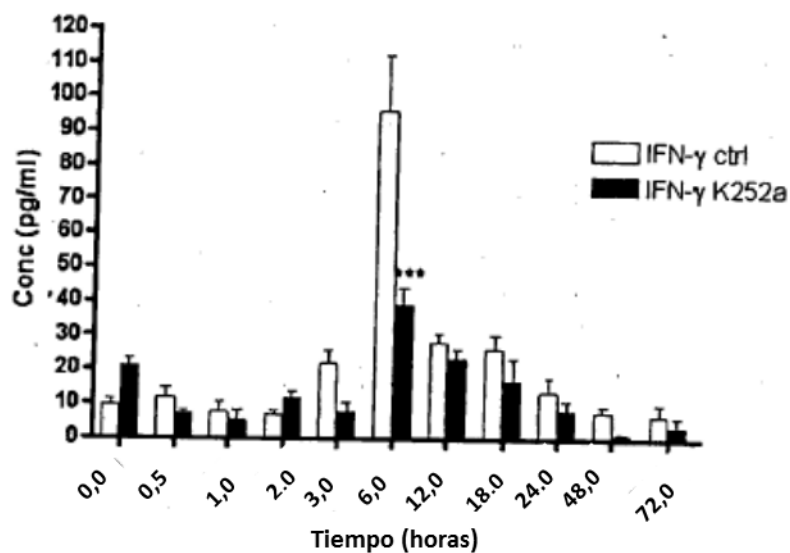
Fuente de variación	% de variación total	Valor P
Interacción	7,46	0,0003 ***
Tratamiento	1,63	0,0044 **
Tiempo (horas)	78,49	P<0,0001 ***

Figura 13a



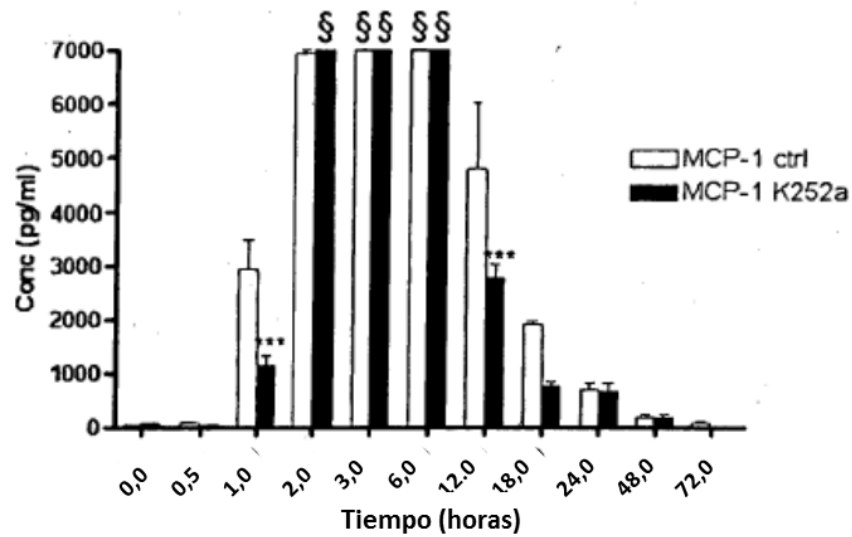
Fuente de variación	% de variación total	Valor P
Interacción	19,75	0,0005 ***
Tratamiento	3,30	0,0145 *
Tiempo (horas)	42,82	P<0.0001 ***

Figura 13b



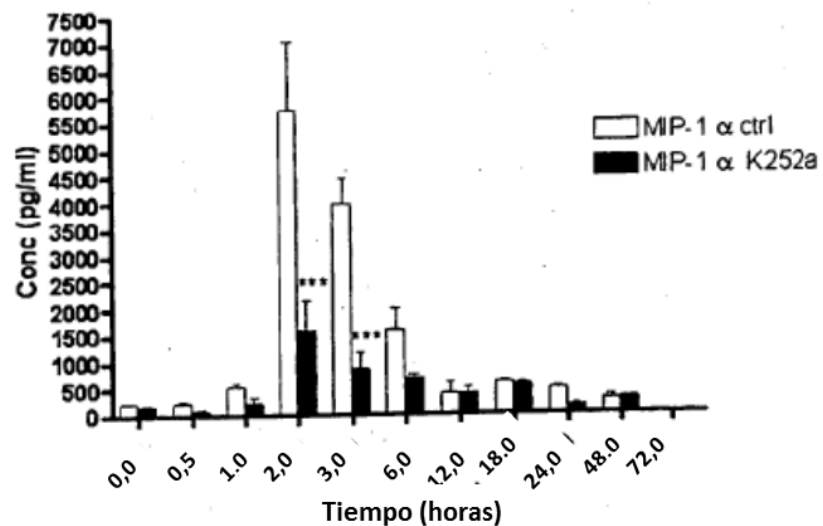
Fuente de variación	% de variación total	Valor P
Interacción	15,72	P<0,0001 ***
Tratamiento	3,27	0,0007 ***
Tiempo (horas)	65,94	P<0,0001 ***

Figura 13c



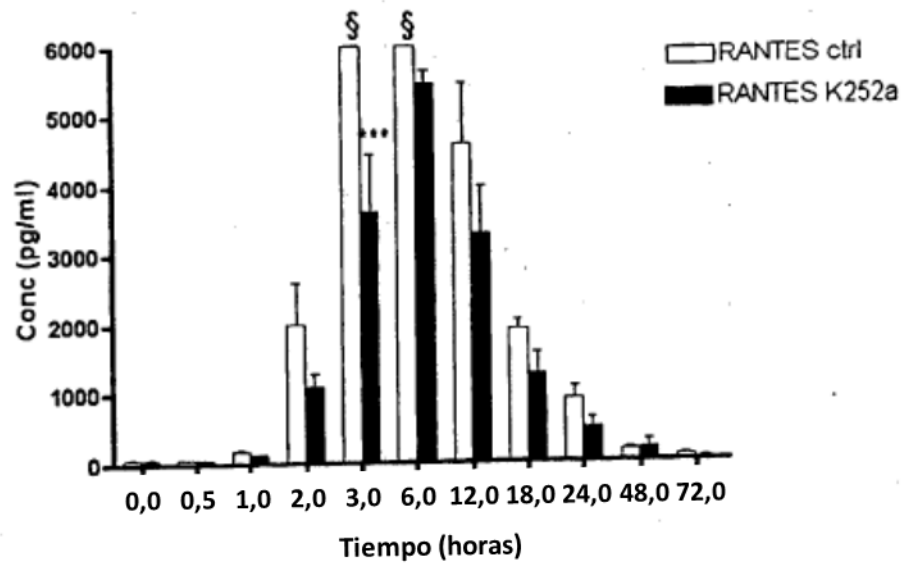
Fuente de variación	% de variación total	Valor P
Interacción	1,67	0,0010 ***
Tratamiento	0,60	0,0008 ***
Tiempo (horas)	94,49	P<0,0001 ***

Figura 13d



Fuente de variación	% de variación total	Valor P
Interacción	20,65	P<0,0001 ***
Tratamiento	4,75	0,0013 **
Tiempo (horas)	50,55	P<0,0001 ***

Figura 13e



Fuente de variación	% de variación total	Valor P
Interacción	2,55	0,1829 **
Tratamiento	2,13	0,0010 ***
Tiempo (horas)	80,96	P<0,0001 ***