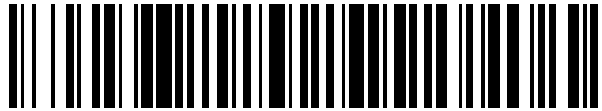


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 484 000**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/48**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2009 E 09795791 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2381964**

54 Título: **Síntesis de conjugados poliméricos de compuestos de indolocarbazol**

30 Prioridad:

**22.12.2008 US 139816 P**  
**12.02.2009 US 152055 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.08.2014**

73 Titular/es:

**CREABILIS S.A. (100.0%)**  
**12 rue Léon Thyes**  
**2636 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

**BAGNOD, RAFFAELLA;**  
**BECCARIA, LUCA;**  
**BERTARIONE RAVA ROSSA, LUISA;**  
**CRISCUOLO, DOMENICO;**  
**LORENZETTO, CHIARA;**  
**MAINERO, VALENTINA;**  
**MARCONI, ALESSANDRA;**  
**PINCELLI, CARLO y**  
**TRAVERSA, SILVIO**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 484 000 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**

Síntesis de conjugados poliméricos de compuestos de indolocarbazol.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de conjugados poliméricos de compuestos de indolocarbazol, en particular de conjugados poliméricos de K-252a y derivados de los mismos, por una ruta sintética que da como resultado un producto muy puro, con un alto rendimiento de producto.

En un aspecto más la presente invención se refiere a nuevos conjugados poliméricos de K-252a y derivados de los mismos, en los que el grupo químico que une la unidad polimérica al compuesto K-252a o al compuesto derivado de K-252a se caracteriza por una estructura cíclica oxazolidindiónica de 5 miembros. Estos nuevos conjugados poliméricos se obtienen por la nueva ruta sintética con alta pureza y altos rendimientos.

En la bibliografía el potencial terapéutico de K-252a y derivados del mismo en la prevención, alivio y tratamiento de patologías asociadas a la cinasa, en particular de patologías asociadas a HMGB1 tales como trastornos neurológicos, neuropatías y trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso central y periférico se describe (por ejemplo a partir de la patente europea PCT/EP2005/008258, Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2.004; 44: 451-74; Neurochem Int. Nov-Dic 2.001; 39 (5-6): 459-68; Neuroport. 9 de noviembre de 2.000; 11 (16): 3.453-6; Neuroscience. Sep. 1.998; 86 (2): 461-72; Brains Res. 4 de julio de 1.994; 650 (1): 170-4). Por otra parte, el estado de la técnica describe la eficacia terapéutica de estos compuestos de indolocarbazol en la prevención, alivio y tratamiento de patologías dérmicas, en particular patologías dérmicas asociadas a una proliferación excesiva de queratinocitos, tales como soriasis (por ejemplo de la patente internacional WO 2005/014003, Raychaudhuri et al., J. Invest. Dermatol. 122: 812-819, 2.004). Aún además se indicó en la técnica que K-252a y sus derivados son útiles como agentes activos contra dolor relacionado con NGF (por ejemplo de Koizumi et al., J. Neurosci. 8: 715-721, 1.988; Doherti et al., Neurosci. Lett. 96: 1-6, 1.989; Matsuda et al, Neurosci. Lett. 87: 11-17, 1.988, Winston JH et al. *J. Pain* (2.003) 4: 329-337). Por lo tanto, la importancia biológica y la actividad terapéutica del compuesto de indolocarbazol K-252a y sus derivados se indican en la bibliografía (por ejemplo de Kim et al., Biol. Pharm. Bull. 21: 498-505, 1.998, Schneider et al., Org. Lett. 7: 1.695-1.698, 2.005).

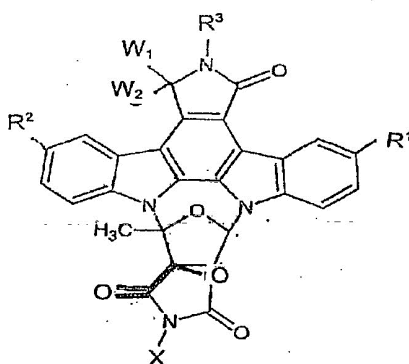
Los conjugados poliméricos de K-252a y derivados de los mismos y su uso como agentes activos en composiciones farmacéuticas útiles para la prevención, alivio y tratamiento de patologías como se describió anteriormente se describen en la patente internacional WO 2007/022999. Según la patente internacional WO 2007/022999 el objetivo de la conjugación a un polímero y en particular de la pegilación de los compuestos derivados de indolocarbazol de K-252a activos, es desarrollar formas de administración de dichos compuestos activos que permite una realización farmacocinética y toxicológica mejorada, consiguiendo la mejor biodisponibilidad de K-252a o de su derivado en las diversas posibles rutas de aplicación.

La propuesta sintética descrita en la patente internacional WO 2007/022999 para la producción de los conjugados poliméricos de K-252a y sus derivados incluye una unión covalente del resto polimérico a la estructura del indolocarbazol del compuesto de K-252a o sus derivados. En particular la patente internacional WO 2007/022999 describe la reacción de un polímero activado con isocianato con un grupo hidroxilo en la posición C3 del resto tetrahidrofurano del K-252a o su derivado en condiciones de reacción adecuadas, según lo cual se obtiene un enlace carbamida como unión covalente entre el resto polimérico y el compuesto activo.

Puesto que los conjugados poliméricos de K-252a y derivados de los mismos con una alta pureza son muy necesarios para aplicación médica, fue el objeto de la presente invención proporcionar un método para la producción de conjugados poliméricos de los compuestos de indolocarbazol activos, que da como resultado un producto de reacción muy puro, obtenido con rendimientos altos y consistentes. Por otra parte, el objetivo de la invención fue además eliminar etapas de purificación complejas y permitir una purificación y recuperación fáciles del compuesto conjugado polimérico diana, para maximizar la eficacia de la reacción de conjugación polimérica.

Sorprendentemente, los autores encontraron que haciendo reaccionar el K-252a o compuesto derivado con un resto polimérico de  $\omega$ -1-H-imidazol-carboxamida usado como reactivo polimérico de partida de la reacción de conjugación proporcionaba un procedimiento de conjugación controlada, obteniéndose así un rendimiento y una pureza mayores deseados del conjugado polimérico de indolocarbazol resultante.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un conjugado polimérico de un compuesto de indolocarbazol de la fórmula (I):



fórmula (I)

en la que:

$R^1$  y  $R^2$  son el mismo o un resto diferente y se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en:

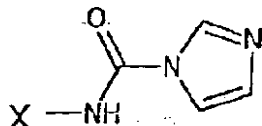
- 5 (a) hidrógeno, halógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alquenilo inferior sustituido o no sustituido, alquinilo inferior sustituido o no sustituido, hidroxilo, alcoxi inferior, carboxi, alcoxicarbonilo inferior, acilo, nitro, carbamoilo, alquilaminocarbonilo inferior,  $-NR^5R^6$ , en el que  $R^5$  y  $R^6$  se seleccionan cada uno independientemente de 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, aralquilo sustituido o no sustituido, alquilaminocarbonilo inferior sustituido o no sustituido, arilaminocarbonilo inferior sustituido o no sustituido, alcoxicarbonilo, carbamoilo, acilo o  $R^5$  y  $R^6$  se combinan con un átomo de nitrógeno para formar un grupo heterocíclico,
- 10 (b)  $-CO(CH_2)_jR^4$ , en el que  $j$  es 1 a 6 y  $R^4$  se selecciona del grupo que consiste en :
- (i) hidrógeno, halógeno,  $-N_3$ ,
- (ii)  $-NR^5R^6$ , en el que  $R^5$  y  $R^6$  son como se definió anteriormente,
- 15 (iii)  $-SR^7$ , en el que  $R^7$  se selecciona del grupo que consiste en: 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, aralquilo sustituido o no sustituido,  $-(CH_2)_aCO_2R^{10}$  (en el que  $a$  es 1 ó 2 y en el que  $R^{10}$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo inferior sustituido o no sustituido) y  $-(CH_2)_aCO_2NR^5R^6$ ,
- 20 (iv)  $-OR^8$ ,  $-OCOR^8$ , en los que  $R^8$  se selecciona de 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
- (c)  $-CH(OH)(CH_2)_jR^4$ , en el que  $j$  y  $R^4$  son como se definió anteriormente;
- 25 (d)  $-(CH_2)_dCHR^{11}CO_2R^{12}$  o  $-(CH_2)_dCHR^{11}CONR^5R^6$ , en los que  $d$  es 0 a 5,  $R^{11}$  es hidrógeno,  $-CONR^5R^6$  o  $-CO_2R^{13}$ , en el que  $R^{13}$  es hidrógeno o en el que alquilo inferior sustituido o no sustituido y  $R^{12}$  es hidrógeno o un alquilo inferior sustituido o no sustituido;
- (e)  $-(CH_2)_kR^{14}$  en el que  $k$  es 2 a 6 y  $R^{14}$  es halógeno, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido,  $-COOR^{15}$ ,  $-OR^{15}$ , (en los que  $R^{15}$  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 o acilo sustituido o no sustituido),  $-SR^7$  (en el que  $R^7$  es como se definió anteriormente),  $-CONR^5R^6$ ,  $-NR^5R^6$  (en los que  $R^5$  y  $R^6$  son como se definió anteriormente) o  $-N_3$ ;
- 30 (f)  $-CH=CH(CH_2)_mR^{16}$ , en el que  $m$  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,  $-COOR^{15}$ ,  $-OR^{15}$  (en los que  $R^{15}$  es como se definió anteriormente)  $-CONR^5R^6$  o  $-NR^5R^6$  (en los que  $R^5$  y  $R^6$  son como se definió anteriormente);
- 35 (g)  $-CH=C(CO_2R^{12})_2$ , en el que  $R^{12}$  es como se definió anteriormente;
- (h)  $-C\equiv C(CH_2)_nR^{16}$ , en el que  $n$  es 0 a 4 y  $R^{16}$  es como se definió anteriormente;
- (i)  $-CH_2OR^{22}$ , en el que  $R^{22}$  es tri-(alquilo inferior)sililo en que los tres grupos alquilo inferiores son el mismo o diferentes o en el que  $R^{22}$  tiene el mismo significado que  $R^8$ .

(j)  $-\text{CH}(\text{SR}^{23})_2$  y  $-\text{CH}_2\text{-SR}^7$  en el que  $\text{R}^{23}$  es alquilo inferior, alqueno inferior o alquino inferior y en el que  $\text{R}^7$  es como se definió anteriormente y

$\text{R}_3$  es hidrógeno, halógeno, acilo, carbamoilo, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alqueno inferior sustituido o no sustituido, alquino inferior sustituido o no sustituido o amino y

- 5  $\text{W}^1$  y  $\text{W}^2$  son independientemente hidrógeno, hidroxilo o  $\text{W}^1$  y  $\text{W}^2$  representan juntos oxígeno y en la que X es un resto polimérico,

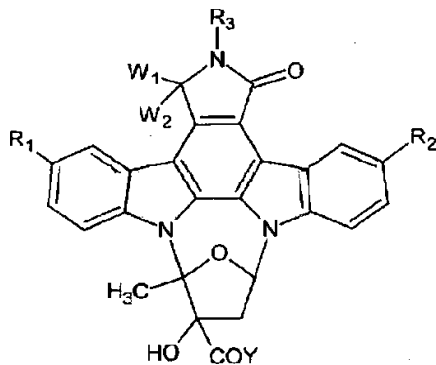
según lo cual el procedimiento comprende hacer reaccionar un compuesto polimérico de  $\omega$ -1 H-imidazol-carboxamida de fórmula general (II):



10 fórmula (II)

en la que X se define como anteriormente,

con un compuesto de indolocarbazol de fórmula general (III)



fórmula (III)

- 15 en la que  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{W}_1$  y  $\text{W}_2$  se definen como anteriormente y que están protegidos opcionalmente por grupos protectores y en la que Y representa un grupo saliente y en la que el procedimiento comprende además opcionalmente desproteger los grupos protectores de los  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{W}_1$  y  $\text{W}_2$  opcionalmente protegidos para obtener el compuesto de la fórmula (I).

20 La reacción de conjugación del procedimiento de la invención para sintetizar el compuesto polimérico conjugado de la fórmula (I) se cataliza mediante una base en un disolvente orgánico. Preferiblemente, la base es una base fuerte. En una realización preferida de la presente invención, la base se selecciona del grupo de hidruros de metal alcalino, aminas terciarias y/o alcóxido. En una realización muy preferida de la presente invención, la base que cataliza la reacción de conjugación polimérica de la invención es hidruro de sodio. Otras bases, tales como metóxido de sodio o trietilamina también se pueden usar, sin embargo.

- 25 La relación molar del catalizador básico al compuesto de la fórmula (III) está preferiblemente entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 4:1, lo más preferiblemente aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1,5:1 y lo más preferiblemente aproximadamente 1:1.

30 Además, la reacción de la invención se realiza en un disolvente orgánico, preferiblemente en condiciones anhidras, es decir, en un disolvente orgánico seco. Preferiblemente, el contenido en agua en la mezcla de la disolución del procedimiento de conjugación es igual o menor que 200 ppm. El disolvente orgánico se puede seleccionar del grupo de diclorometano, cloroformo, N,N-dimetilformamida. En una realización muy preferida de la presente invención, el disolvente orgánico es diclorometano, incluso más preferiblemente diclorometano anhidro.

Se prefiere además según la invención que la reacción de conjugación se realice en atmósfera de gas inerte, tal como atmósfera de nitrógeno o argón.

- 35 Por otra parte, la reacción del procedimiento de la invención se realiza preferiblemente a una temperatura de aproximadamente  $-10^\circ$  a aproximadamente  $60^\circ\text{C}$ , más preferiblemente de aproximadamente  $0^\circ$  a aproximadamente  $25^\circ\text{C}$  y lo más preferiblemente a temperatura ambiente después de una etapa inicial a  $0^\circ\text{C}$ .

Después de la producción del compuesto diana de la fórmula (I) según el procedimiento de la invención, el conjugado polimérico de la fórmula (I) se puede separar después y purificar de la mezcla de reacción. Según una realización preferida de la invención el compuesto de la fórmula (I) se obtiene por purificación de la mezcla bruta por cromatografía por desorción súbita. Se usa preferiblemente un sistema de purificación por desorción súbita en gradiente automatizado y está provisto de una columna y disolvente adecuados. El método de purificación se selecciona preferiblemente de columnas de fase inversa y de fase directa y el disolvente de acondicionamiento/elución se selecciona preferiblemente de diclorometano, agua, metanol, acetonitrilo, disolución tampón de formiato de amonio a diferentes relaciones de mezcla. En una realización muy preferida de la invención el compuesto polimérico de indolocarbazol de la fórmula (I) se purifica por una cromatografía por desorción súbita de fase inversa provista de un cartucho C18 y la purificación se realiza por elución isocrática con tampón de acetonitrilo/formiato de amonio 5 mM (pH 3,5) 40:60 (como se indica en el Ejemplo 3). En una realización preferida más de la invención, el compuesto polimérico de indolocarbazol de la fórmula (I) se purifica por una cromatografía por desorción súbita de fase normal (como se describe en los Ejemplos 4 y 5.3).

El producto se puede secar después por ej., sobre sulfato de sodio y separar por filtración y se elimina el disolvente por evaporación a presión reducida a 25°C. La purificación del producto diana se realiza por técnicas comunes conocidas por el experto en la materia.

Después de la etapa de purificación el compuesto polimérico resultante de la fórmula (I) presenta una pureza de al menos aproximadamente 95%. Más preferiblemente después de la etapa de purificación el compuesto de la fórmula (I) presenta una pureza de al menos aproximadamente 98%. En una realización incluso más preferida el compuesto polimérico resultante presenta una pureza de 98,5%, 99% o incluso 99,5%.

Por otra parte, el procedimiento de la presente invención da como resultado un rendimiento másico total del compuesto de la fórmula (I) de aproximadamente 40% a aproximadamente 98% en peso, preferiblemente de aproximadamente 50% a aproximadamente 95% en peso basado en el peso del compuesto reaccionante de la fórmula (III).

El resto Y de la fórmula (III) es un grupo saliente, es decir, un grupo que en las condiciones de reacción de la conjugación de polímeros de la invención se elimina de la estructura del compuesto de la fórmula (III) para obtener el ciclo oxazolidindiónico del compuesto de la fórmula (I), que une mediante enlaces covalentes el resto polimérico a la estructura del indolocarbazol del K-252a o su compuesto derivado. Según la invención, también se elimina el anillo de imidazol del compuesto de fórmula general (II) durante la reacción de conjugación del resto reaccionante polimérico para obtener el compuesto de la fórmula (I).

En una realización preferida de la presente invención, el grupo saliente Y de la fórmula (III) se selecciona del grupo que incluye un triflato, un tosilato, un mesilato, un sulfato, un halógeno, un hidroxilo o un grupo alcoxi inferior. En una realización especialmente preferida, el grupo saliente Y de la fórmula (III) es un grupo alcoxi inferior o un grupo hidroxilo. Lo más preferiblemente, el grupo saliente Y es un grupo alcoxi inferior, en particular un grupo metoxi.

El resto polimérico que está unido mediante enlaces covalentes al compuesto de indolocarbazol con el procedimiento de la presente invención y que se representa, por ejemplo, en las fórmulas generales (I) y (II) por X, tiene que ser biocompatible, puede ser de origen natural o semi-sintético o sintético y puede presentar una estructura lineal o ramificada. Preferiblemente, el polímero X en la presente invención se selecciona de poli(óxidos de alquileo), en particular de óxidos de (polietileno). Sin embargo, polímeros ejemplares adicionales incluyen sin limitación poli(ácido acrílico), poli(acrilatos), poli(acrilamida o N-alquilderivados de los mismos, poli(ácido metacrílico), poli(metacrilatos), poli(ácido etilacrílico), poli(etilacrilatos), polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico), dextrano, quitosán, poliaminoácidos, hidroxietil almidón.

Para participar en el procedimiento de la presente invención, en particular para que se funcionalice para el polímero reaccionante de la fórmula (II) del procedimiento de la invención, el resto polimérico ya mencionado debería soportar un grupo terminal funcional amino o se debería funcionalizar para soportar un grupo terminal funcional amino. Por lo tanto, el resto polimérico debería ser un polímero amino-activado de fórmula general X-NH<sub>2</sub>.

De hecho, el reactivo polimérico de partida de la fórmula (II) se obtiene por reacción del grupo amino de un resto polimérico con un compuesto de 1,1-carbonildiimidazol para obtener un compuesto polimérico de ω-1H-imidazol-carboxamida de fórmula general (II).

La formación del compuesto polimérico ω-1H-imidazol-carboxamida de fórmula (II) se realiza preferiblemente en un disolvente orgánico tal como diclorometano, cloroformo, N,N-dimetilformamida. En una realización muy preferida, el disolvente orgánico es diclorometano, incluso más preferiblemente diclorometano anhidro.

Se prefiere además según la invención, que la activación del ω-amino-polímero se realice en atmósfera de gas inerte, tal como atmósfera de nitrógeno o argón.

Por otra parte, la reacción de formación del compuesto polimérico ω-1H-imidazol-carboxamida de la invención se realiza preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 10° a aproximadamente 60°C, más preferiblemente

de aproximadamente 15° a aproximadamente 25°C y lo más preferiblemente a temperatura ambiente.

En una realización muy preferida de la presente invención, el resto polimérico X es un resto de polietilenglicol (PEG), en el que el grupo OH terminal se puede modificar opcionalmente por ej., con grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> o acilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, preferiblemente con grupos alquilo C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> o C<sub>3</sub> o grupos C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> o C<sub>3</sub>. Preferiblemente, el polietilenglicol modificado es un polietilenglicol alcoxi-sustituido de manera terminal, más preferiblemente un metoxi-polietilen-glicol (mPEG).

El polímero usado según la presente invención tiene un peso molecular que oscila de aproximadamente 100 a aproximadamente 100.000 Da, preferiblemente de aproximadamente 200 a aproximadamente 50.000 Da y más preferiblemente de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 Da. Según un aspecto preferido de la invención, el polímero es un poli(etilenglicol) de cadena corta, preferiblemente un PEG alcoxi-sustituido de manera terminal, tal como un poli(etilenglicol) metoxi-sustituido con un peso molecular que oscila de aproximadamente 200 a aproximadamente 1.500 Da, preferiblemente de aproximadamente 400 a aproximadamente 1.200 Da e incluso más preferiblemente de aproximadamente 550 a aproximadamente 1.100. En la realización más preferida, el PEG o mPEG de cadena corta tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 550 Da o de aproximadamente 1.100 Da. Según un segundo aspecto preferido de la invención, el polímero es un poli(etilenglicol) de cadena larga, preferiblemente un PEG alcoxi-sustituido de manera terminal, tal como poli(etilenglicol) metoxi-sustituido, con un peso molecular que oscila de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 6.000 Da y preferiblemente de aproximadamente 4.500 a aproximadamente 5.500 Da. En la realización más preferida de este aspecto de la invención, el PEG o mPEG de cadena larga tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 Da o de aproximadamente 5.000 Da.

El término "aproximadamente" como se usó anteriormente para definir los valores e intervalos de pesos moleculares del resto polimérico de la invención significa que los valores y/o límites de oscilación indicados pueden variar dentro de ± 20%, preferiblemente dentro de ± 10%.

Como se usa en esta solicitud, excepto cuando se proporcione expresamente de otro modo en la presente memoria, cada uno de los siguientes términos tendrá el significado explicado a continuación.

El término "alquilo inferior", cuando se usa solo o junto con otros grupos, significa un grupo alquilo inferior de cadena lineal o ramificado que contiene de 1-6 átomos de carbono, preferiblemente de 1-5, más preferiblemente de 1-4 y especialmente preferiblemente 1-3 ó 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 del "alcoxi inferior", el "alcoxicarbonilo inferior", el "alquilaminocarbonilo inferior", "hidroxialquilo inferior" y de los grupos "tri-(alquil inferior)sililo" tiene el mismo significado que "alquilo inferior" definido anteriormente.

Los grupos "alqueno inferior" se definen como grupos alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> que pueden ser de cadena lineal o ramificados 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 ej., 1, 3 ó 2,4-pentadienilo y similares. Grupos alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> más preferidos son grupos alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> e incluso más preferiblemente grupos alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>.

El término grupos "alquino inferior" se refiere a grupos alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> que pueden ser de cadena lineal o ramificados 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 alquino C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> más preferidos son grupos alquino C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> e incluso más preferiblemente grupos alquino C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>.

El término grupo "arilo" se refiere a grupos arilo C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> que contienen de 6 hasta 14 átomos de carbono del anillo. Estos grupos pueden ser mono-, bi- o tricíclicos y son anillos condensados. Los grupos arilo preferidos incluyen fenilo, bifenilo, naftilo, antraceno, fenantreno y similares. El resto arilo de los grupos "arilcarbonilo" y el "arilaminocarbonilo" tiene el mismo significado que se definió anteriormente.

El término grupos "heteroarilo" puede contener 1 a 3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, azufre u oxígeno y se refiere a grupos heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>13</sub>. Estos grupos pueden ser mono-, bi- o tricíclicos. Los grupos heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>13</sub> de la presente invención incluyen compuestos heteroaromáticos y grupos heterocíclicos saturados y parcialmente saturados. Estos compuestos heterocíclicos pueden ser monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos. Grupos heterocíclicos de 5 ó 6 miembros preferidos son tienilo, furilo, pirrolilo, piridilo, piranilo, morfolinilo, pirazinilo, metilpirrolilo y piridazinilo. El heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>13</sub> puede ser un grupo heterocíclico bicíclico. Grupos heterocíclicos bicíclicos preferidos son benzofurilo, benzotienilo, indolilo, imidazolilo y pirimidinilo. Los heteroarilos C<sub>3</sub>-C<sub>13</sub> más preferidos son furilo y piridilo.

El término "alcoxi inferior" incluye grupos alcoxi que contienen de 1 a 6 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 5, más preferiblemente de 1-4 y especialmente preferiblemente 1 a 3 ó 1 a 2 átomos de carbono y pueden ser de cadena lineal o ramificados. Estos grupos incluyen metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, isopropoxi, terc-butoxi, pentoxi, hexoxi y similares.

El término "acilo" incluye alcanoílo inferior que contiene 1 a 6 átomos de carbono, preferiblemente 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 ramificado. Estos grupos incluyen preferiblemente formilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, butirilo terciario, pentanoilo y hexanoilo. El resto acilo del grupo "aciloxi" tiene el mismo significado que se definió anteriormente.

El término "halógeno" incluye flúor, cloro, bromo, yodo y similares.

- 5 El término grupo "aralquilo" se refiere a aralquilo  $C_7-C_{15}$  en el que el grupo alquilo está sustituido por un arilo. El grupo alquilo y arilo se puede seleccionar de los grupos alquilo  $C_1-C_6$  y los grupos arilo  $C_6-C_{14}$  como se definió anteriormente, en los que el número total de átomos de carbono está entre 7 y 15. Grupos aralquilo  $C_7-C_{16}$  preferidos 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 definió anteriormente.
- 10 Los grupos alquilo, alqueno y alquino inferiores, sustituidos, tienen 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente, tales como alquilo inferior, hidroxilo, alcoxi inferior, carboxilo, (alcoxi inferior)carbonilo, nitro, halógeno, amino, mono- o di-(alquil inferior)amino, dioxolano, dioxano, ditiolano y ditiona. El resto sustituyente alquilo inferior de los grupos alquilo, alqueno y alquino inferiores, sustituidos, y el resto alquilo inferior de los sustituyentes alcoxi inferior, el (alcoxi inferior)carbonilo y el mono- o di-(alquil inferior)amino de los grupos alquilo, alqueno y alquino inferiores, sustituidos, tienen el mismo significado que "alquilo inferior" definido anteriormente.
- 15

Los grupos arilo sustituido, el heteroarilo sustituido y el aralquilo sustituido tienen cada uno 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente, tales como alquilo inferior, hidroxilo, alcoxi inferior, carboxilo, (alcoxi inferior)carbonilo, nitro, amino, mono- o di-(alquil inferior)amino y halógeno. El resto alquilo inferior de los grupos alquilo inferior, el alcoxi inferior, el (alcoxi inferior)carbonilo y el mono- o di-(alquil inferior)amino entre los sustituyentes tiene el mismo significado que alquilo inferior definido anteriormente.

20

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

Preferiblemente,  $R^1$  y  $R^2$  se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: hidrógeno, halógeno, nitro, - $CH_2OH$ ,  $-(CH_2)_kR^{14}$ ,  $-CH=CH(CH_2)_mR^{16}$ ,  $-C\equiv C(CH_2)_nR^{15}$ ,  $-CO(CH_2)_jR^4$  en los que  $R^4$  es  $-SR^7$ ,  $CH_2O$  - alquilo inferior (sustituido o no sustituido) (en los que el alquilo inferior sustituido es preferiblemente metoximetilo, metoxietilo o etoximetilo),  $-NR^5R^6$ .

25

En los significados preferidos anteriores de  $R^1$  y  $R^2$ , el resto  $R^{14}$  se selecciona preferiblemente de: fenilo, piridilo, imidazolilo, tiazolilo, tetrazolilo,  $-COR^{15}$ ,  $-OR^{15}$  (en los que  $R^{15}$  se selecciona preferiblemente de: hidrógeno, metilo, etilo, fenilo o acilo),  $-SR^7$  (en el que  $R^7$  se selecciona preferiblemente de alquilo inferior sustituido o no sustituido, 2-tiazolilo y piridilo) y  $-NR^5R^6$  (en el que  $R^5$  y  $R^6$  se seleccionan preferiblemente de: hidrógeno, metilo, etilo, fenilo, carbamoilo y (alquil inferior)aminocarbonilo). Por otra parte, el resto  $R^{16}$  se selecciona preferiblemente de: hidrógeno, metilo, etilo, fenilo, imidazol, tiazol, tetrazol,  $-COR^{16}$ ,  $-OR^{15}$  y  $-NR^5R^6$  (en los que los restos  $R^{15}$ ,  $R^5$  y  $R^6$  tienen los significados preferidos como se describió anteriormente). En los significados preferidos anteriores de  $R^1$  y  $R^2$ , el resto  $R^7$  se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en alquilo inferior sustituido o no sustituido, fenilo, piridilo, pirimidinilo, tiazol y tetrazol, sustituido o no sustituido. Además k es preferiblemente 2, 3 ó 4, j es preferiblemente 1 ó 2 y m y n son independientemente preferiblemente 0 ó 1.

30

35

Preferiblemente,  $R^3$  es hidrógeno o acetilo, lo más preferiblemente hidrógeno. Además, cada  $W^1$  y  $W^2$  es preferiblemente hidrógeno.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al compuesto K-252a conjugado a un resto polimérico. Una realización incluso más preferida se refiere a conjugados poliméricos de K-252a y derivados de los mismos, en los que el grupo químico que une la unidad polimérica al compuesto de K-252a o al compuesto derivado de K-252a se caracteriza por una estructura cíclica oxazolidindiónica de 5 miembros. Por lo tanto, en una realización muy preferida de la presente invención, el conjugado polimérico de la fórmula (I) se representa por un compuesto en el que  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $W_1$  y  $W_2$  son hidrógeno y X es el resto polimérico. Según esta realización muy preferida de la invención el resto polimérico es un resto polietilenglicol (PEG) o un metoxi-polietilenglicol (m-PEG). Incluso más preferido el polietilenglicol o metoxi-polietilenglicol de la realización preferida de la invención es un polímero de PEG o mPEG de cadena larga con un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 Da o aproximadamente 5.000 Da. Asimismo es preferido un polietilenglicol o metoxi-polietilenglicol de cadena corta con un peso molecular promedio de aproximadamente 550 Da o aproximadamente 1.100 Da.

40

45

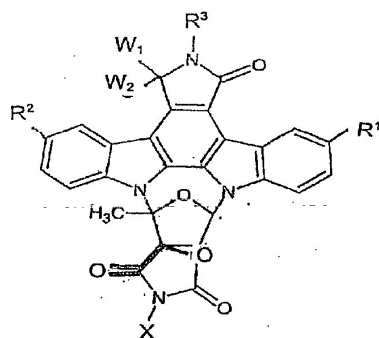
El procedimiento de la presente invención comprende opcionalmente la etapa de proteger con un grupo protector uno, más o todos los sustituyentes  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $W_1$  y  $W_2$  del compuesto de indolocarbazol del compuesto de K-252a o derivado. En este contexto el término "grupos protectores" se refiere a cualquier derivado de los sustituyentes  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $W_1$  y  $W_2$  conocidos en la técnica, que se pueden usar, si es necesario, para enmascarar  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $W_1$  y  $W_2$  durante el procedimiento de síntesis y que se pueden retirar después en las condiciones que den como resultado que los sustituyentes  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $W_1$  y  $W_2$  se recuperen sin efectos no deseados en el resto de la molécula. En particular - si es necesario - se introduce un grupo protector en uno, más o todos los sustituyentes  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $W_1$  y  $W_2$  durante el procedimiento de conjugación de la invención para obtener quimioselectividad de la conjugación

50

55

polimérica en la posición C3 de la estructura del indolocarbazol del compuesto de K-252a o derivado. Después de la reacción de conjugación, uno o más grupos protectores se pueden retirar de manera reversible para devolver el grupo funcional original de los sustituyentes  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $W_1$  y  $W_2$  implicados obteniendo el compuesto conjugado de indolocarbazol de la fórmula (I).

- 5 Según la presente invención, cualquier grupo protector adecuado conocido en la técnica se puede usar con este fin. La elección del grupo protector adecuado así como cualquier medio y condiciones adecuados para proteger y desproteger los sustituyentes  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $W_1$  y  $W_2$  se pueden conseguir por el experto por este conocimiento general en la técnica de la síntesis orgánica. Los medios y las condiciones para proteger y desproteger empleados dependen de la naturaleza de los grupos funcionales implicados  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $W_1$  y  $W_2$ . Los grupos protectores para restos hidroxilo-, amino- y/o carboxi se seleccionan preferiblemente de: acetona, etilidimetoximetilo, 2-metoxietoximetilo, benciloximetilo, tetrahidropirano, metilo, etilo, isopropilo, t-butilo, bencilo, trifenilmetilo, t-butildimetilsililo, trifenilsililo, metoxycarbonilo, t-butiloxycarbonilo, benciloxycarbonilo, fluorenilmetoxycarbonilo, acetilo, benzoilo, toluenosulfonilo, dimetoxibencilo, nitrofeniloxycarbonilo, nitrobenciloxycarbonilo, alilo, fluorenilmetilo, tetrahidrofurano, fenacilo, acetol, fenilo, trimetilsililo, pirrolidilo, indolilo, hidrazino y otros grupos protectores conocidos en la técnica tales como los que se pueden encontrar en Greene T. W., et al., Protective Grupos en Organic Synthesis, 4<sup>a</sup> ed., John Wiley and Son, Nueva York, NY (2.007). Los reactivos y las condiciones para proteger y desproteger las reacciones se seleccionan en particular para su conveniencia en la unión y eliminación de manera selectiva del grupo protector sin que afecte de manera adversa al resto del compuesto. Las condiciones y los reactivos adecuados se conocen comúnmente en la práctica del experto.
- 20 Según la presente invención, los compuestos de la fórmula (I) también se pueden preparar como sales farmacéuticamente aceptables incluyendo sales de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, yodhídrico, bromhídrico, fosfórico, metafosfórico, ácido nítrico y ácido sulfúricos así como sales de ácidos orgánicos, tales como tartárico, acético, cítrico, málico, benzoico, glicólico, glucónico, succínico, arilsulfónico, (por ej., ácidos p-toluenosulfónicos, benzenosulfónico), fosfórico, malónico y similares. Los ácidos adecuados para la formación de sales farmacéuticamente aceptables son conocidos para un experto en la materia. Además, las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos de la fórmula (I) se pueden formar con un catión farmacéuticamente aceptable. Los cationes farmacéuticamente aceptables son conocidos para un experto en la técnica e incluyen cationes alcalinos ( $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ), cationes alcalino-térreos ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ), amonio y cationes orgánicos, tales como cationes de amonio cuaternario.
- 30 Un aspecto más de la presente invención son nuevos conjugados poliméricos de K-252a y derivados de los mismos, en los que el grupo químico que une la unidad polimérica al compuesto de K-252a o al compuesto derivado de K-252a se caracteriza por una estructura cíclica oxazolidindiónica de 5 miembros. Estos nuevos conjugados poliméricos se producen por el nuevo procedimiento de síntesis descrito en la presente memoria.
- 35 En particular un aspecto más de la presente invención es por lo tanto un conjugado polimérico de un compuesto de indolocarbazol de fórmula (I)



fórmula (I)

en el que  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $W_1$  y  $W_2$  así como el resto polimérico X son como se definió con detalle anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 40 En una realización la más preferida, la invención se refiere al nuevo compuesto conjugado polimérico de la fórmula (I) en el que  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $W_1$  y  $W_2$  son hidrógeno y el resto polimérico X es un polietilenglicol (PEG) o un PEG alcoxi-sustituido de manera terminal, por ej., preferiblemente un metoxi-polietilenglicol (m-PEG). Este compuesto corresponde al compuesto conjugado polimérico de K-252a según la presente invención. Preferiblemente, el resto polimérico es un polietilenglicol de cadena larga, incluso más preferiblemente un PEG alcoxi-sustituido de manera terminal tal como metoxi-polietilenglicol (mPEG) con un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 Da o aproximadamente 5.000 Da. Asimismo preferiblemente el resto polimérico es un polietilenglicol de cadena corta, incluso más preferiblemente un PEG alcoxi-sustituido de manera terminal tal como un metoxi-polietilenglicol (m-PEG) con un peso molecular promedio de aproximadamente 550 Da o aproximadamente 1.100 Da.



Se encontró sorprendentemente por los autores de la presente solicitud que comparado con los miembros de los compuestos de indolocarbazol y en particular comparado con el propio K-252a o sus derivados que carecen de un polímero, los correspondientes compuestos conjugados poliméricos de la fórmula (I) presentan una realización farmacocinética y toxicológica mejorada debido a su solubilidad aumentada, que conduce a una biodisponibilidad mejorada del compuesto terapéutico y biológicamente activo. En otro aspecto de la presente invención, se encontró sorprendentemente que los compuestos de indolocarbazol conjugados poliméricos de la fórmula (I) muestran una absorción sistémica limitada en administración tópica debido a su tamaño molecular y anfipaticidad aumentados, mejorando así la eficacia terapéutica y biológica tópica así como reduciendo la toxicidad sistémica y/o los efectos secundarios debido a aplicación tópica.

Se ha encontrado sorprendentemente además por los autores de la presente solicitud que los conjugados poliméricos de indolocarbazol de la fórmula (I) presentan un aumento significativo en selectividad en la actividad inhibidora contra TrkA tirosina cinasa en comparación con la actividad inhibidora de la cinasa no selectiva de los compuestos de indolocarbazol mismos y en particular de K-252a y sus derivados que carecen de polímero. Así, la conjugación de un compuesto de indolocarbazol y en particular de K-252a a una molécula polimérica según la invención conduce a la previsión de un agente activo selectivo teniendo en cuenta su objetivo terapéutico con la consiguiente disminución de efectos secundarios no deseados.

Por lo tanto, un aspecto más de la presente invención es el uso de compuestos de la fórmula (I) como agentes activos, en un medicamento. En un aspecto preferido de la invención, los compuestos de la fórmula (I) se usan como agentes activos en un medicamento para administración sistémica y tratamiento. En un aspecto asimismo preferido, la invención se refiere al uso de los compuestos de la fórmula (I) como agentes activos en un medicamento tópico.

En particular los compuestos poliméricos conjugados de la presente invención se usan como agentes activos en un medicamento útil para la prevención, alivio y tratamiento de patologías asociadas a HMGB1. Una patología asociada a HMGB1 es una afección en un paciente en el que una concentración aumentada de la proteína nuclear HMGB1 y/o de proteínas homólogas HMGB1 en la forma acetilada o no acetilada está presente en los fluidos biológicos y tejidos, comparado con la concentración en los individuos normales donde estas proteínas nucleares HMGB1 son prácticamente indetectables. Las HMGB1 extracelulares, actúan como quimiocinas proinflamatorias quimiotácticas potentes. Las patologías asociadas a HMGB1 son, por lo tanto, patologías con una fuerte base inflamatoria, patologías que resultan de la estimulación de citocina tales como TNF-alfa, IL-1, IL-6 etc., o patologías que resultan de procesos tóxicos tales como intoxicación, infección, quemadura, etc. En particular, se han encontrado y determinado altas concentraciones de la proteína HMGB1 y proteínas homólogas en el plasma de pacientes con septicemia, en el plasma y fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, en los cerebros de pacientes de la enfermedad de Alzheimer, en el plasma y tejidos de pacientes de melanoma, en el plasma de pacientes de lupus eritematoso sistémico, en placas ateroscleróticas de pacientes ateroscleróticos, etc. La determinación y evidencia de proteína HMGB1 y/o proteínas homóloga sin fluidos y tejidos biológicos se pueden detectar por herramientas de diagnóstico comunes conocidas por el experto en la materia, que incluye, por ejemplo, detección por ensayos ELISA etc.

Por lo tanto, una serie de enfermedades se caracterizan por la presencia pertinente de HMGB1 extracelular, que en particular incluyen pero no se limitan a enfermedades inflamatorias, estenosis, reestenosis, aterosclerosis, artritis reumatoide, enfermedades autoinmunitarias, tumores, enfermedades infecciosas, septicemia, lesión 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 la fórmula (I) se usan para la prevención, alivio y tratamiento de enfermedades cardiovasculares, en particular aterosclerosis y/o reestenosis que tiene lugar durante o después de angioplastia. Más preferiblemente, el medicamento se usa para bloquear, retardar y/o debilitar la regeneración de tejido conjuntivo en reestenosis durante o después de angioplastia.

En un aspecto preferido en particular de la invención, los compuestos poliméricos conjugados de la fórmula (I) son eficaces para el uso como agente activo en un medicamento para la prevención, alivio y tratamiento de trastornos neurológicos, neuropatías y trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso central y periférico.

Se demostró además por los autores que los nuevos compuestos conjugados poliméricos pueden reducir y/o inhibir la secreción de citocinas del plasma por tratamiento sistémico. Por lo tanto, los compuestos conjugados poliméricos se usan como agentes activos en un medicamento para administración sistémica útil para la prevención, alivio y/o tratamiento de patologías en que está implicado un aumento de secreción de citocinas del plasma. Estas patologías son preferiblemente patologías, en que una secreción de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 y/o RANTES están implicadas principalmente.

En particular, en el contexto de la presente invención, las patologías que están asociadas a una secreción aumentada de citocinas del plasma incluyen pero no se limitan a enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, revascularización después de trasplante de órganos, afecciones cardiovasculares, enfermedades obstétricas y ginecológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades alérgicas y atópicas, patologías de tumores sólidos y líquidos, enfermedades de rechazo de trasplantes, enfermedades congénitas, enfermedades dermatológicas, enfermedades neurológicas, caquexia, enfermedades

renales, afecciones de intoxicaciones iatrogénicas, enfermedades metabólicas e idiopáticas y enfermedades oftalmológicas.

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

10 En otro aspecto particular más 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, alivio y/o tratamiento de patologías dérmicas. Se ha demostrado por los autores de la presente invención que los compuestos poliméricos conjugados descritos en la presente memoria se usan de manera muy ventajosa como medicamento tópico puesto que no muestran efectos adversos o tóxicos (por ej., irritación) cuando se administran de manera dérmica o cualquier efecto fototóxico (por ej., fotomutagenicidad, fototoxicidad o fotosensibilización) (como se muestra en los estudios descritos en los siguientes ejemplos).

15 Las patologías dérmicas preferidas en el contexto de la presente invención son patologías caracterizadas por hiperproliferación de los queratinocitos, tales como soriasis, dermatitis atópica, eccema crónico, acné, pitiriasis rubra pilaris, queloides, cicatrices hipertróficas y tumores cutáneos, tales como queratoacantoma, carcinoma de células escamosas, 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, alivio y tratamiento de soriasis.

20 Debido a la selectividad aumentada de los compuestos de la invención en la inhibición de TrkA, un aspecto más de la invención es el uso de dichos compuestos conjugados en la prevención, alivio y tratamiento de patologías en que TrkA desempeña una función crucial en el mecanismo fisiopatológico, que conduce al desarrollo de las patologías. En este contexto, en una realización muy preferida de la invención, los compuestos poliméricos conjugados de K-252a de las fórmulas (I), (II) y/o (III) se usan como agente activo en un medicamento para la prevención, alivio y tratamiento de dolor relacionado con NGF e hiperalgesia.

25 Por lo tanto, un aspecto más de la presente invención es el uso de un compuesto de la fórmula (I) como se definió anteriormente opcionalmente junto con portadores, adyuvantes, diluyentes o/y aditivos farmacéuticamente aceptables para la fabricación de un medicamento para la prevención, alivio o/y tratamiento de patologías como se definió anteriormente.

30 Los compuestos de la fórmula (I) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos se pueden administrar como son, o en forma de diversas composiciones farmacéuticas según 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 la fórmula (I) opcionalmente junto con portadores, adyuvantes, diluyentes o/y aditivos farmacéuticamente aceptables. Los portadores, adyuvantes, diluyentes o/y aditivos farmacéuticos son conocidos para un experto en la materia y se pueden aplicar por lo tanto en la formulación de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención.

35 Los compuestos de esta invención se pueden emplear como el único agente activo en una composición farmacéutica. Alternativamente, los compuestos de la fórmula (I) se pueden usar junto con uno o varios agentes activos más, por ej., otros agentes farmacéuticos activos en el tratamiento de las patologías definidas anteriormente.

40 En particular, los compuestos conjugados poliméricos de la invención se pueden usar junto con al menos un fármaco antiinflamatorio esteroideo y/o un agente más capaz de inhibir un mediador temprano de la cascada de citocinas inflamatorias, por ej., un antagonista o inhibidor de una citocina seleccionado del grupo que consiste en TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-R $\alpha$ , IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIF-1 $\beta$ , MIP-2, MIF e IL-6. Los fármacos antiinflamatorios útiles en particular se seleccionan de dipropionato de alclometasona, amcinonida, dipropionato de beclometasona, betametasona, benzoato de betametasona, dipropionato de betametasona, fosfato sódico de betametasona, fosfato y acetato sódico de betametasona, valerato de betametasona, butirato de clobetasol, propionato de clobetasol, pivalato de clocortolona, cortisol (hidrocortisona), acetato de cortisol (hidrocortisona), butirato de cortisol (hidrocortisona), cipionato de cortisol (hidrocortisona), fosfato sódico de cortisol (hidrocortisona), succinato sódico de cortisol (hidrocortisona), valerato de cortisol (hidrocortisona), acetato de cortisona, desonida, desoximetasona, dexametasona, acetato de dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, diacetato de diflorasona, valerato de diflucortolona, acetato de fludrocortisona, fludroxicortida, pivalato de flumetasona, flunisolida, acetona de fluocinolona, fluocinonida, flucortolona, fluorometolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, halcinonida, propionato de halobetasol, medrisona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, succinato sódico de metilprednisolona, furoato de mometasona, acetato de parametasona, prednisolona, acetato de prednisolona, fosfato sódico de prednisolona, tebutato de prednisolona, prednisona, triamcinolona, acetato de triamcinolona, acetona de triamcinolona, diacetato de triamcinolona, hexacetona de triamcinolona. Los antagonistas o inhibidores útiles de una citocina se seleccionan de infliximab, etanercept o adalimumab.

Agentes adicionales que se pueden usar junto con los compuestos poliméricos de la invención son por ej., antagonistas y/o inhibidores de RAGE, antagonistas y/o inhibidores de HMGB1, antagonistas y/o inhibidores de la

interacción de un receptor de tipo Toll (TCR) con HMGB1, el dominio de tipo lectina N-terminal funcional (D1) de trombomodulina y/o un ácido nucleico bicatenario sintético o molécula análoga de ácidos nucleicos con una estructura de forma curvada como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2006/002971.

5 La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar de una manera conveniente conocida por un experto en la materia, por ej., por un médico. En particular, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar por inyección o infusión intravenosa, en particular por inyección intravenosa, intramuscular, transmucosal, subcutánea o intraperitoneal o infusión intravenosa y/o por aplicación oral, tópica, dérmica, nasal, por inhalación, en aerosol y/o rectal, etc. La administración puede ser local o sistémica. Preferiblemente, la administración del compuesto y la composición farmacéutica de la invención se puede realizar por administración parenteral, en particular en forma de disoluciones líquidas o suspensiones o administración oral, en particular en forma de comprimidos o cápsulas, o por vía intranasal, en particular en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles o por vía dérmica, vía, por ejemplo, pomadas, cremas, aceites, liposomas o parches transdérmicos.

10 Según un aspecto de la invención, la composición farmacéutica se administra por vía sistémica. En particular, los compuestos conjugados poliméricos se pueden administrar por inyección o infusión intravenosa, en particular por inyección intravenosa, intramuscular, transmucosal, subcutánea o intraperitoneal o infusión intravenosa y/o por administración oral.

15 En una realización lo más preferida más, la composición farmacéutica de la presente invención se administra por aplicación tópica, en particular por aplicación dérmica. En caso de una aplicación dérmica la administración de los compuestos de la presente invención se puede realizar en forma de liposomas.

20 En una realización lo más preferida más de la invención, la composición farmacéutica se administra inmovilizada de manera reversible en la superficie de un dispositivo médico, en particular por unión, recubrimiento y/o inclusión del compuesto y la composición de la invención en un dispositivo médico, tal como pero no limitado a, stents, catéteres, instrumentos quirúrgicos, cánulas, válvulas cardíacas o prótesis vasculares. Después de poner en contacto el dispositivo médico con fluido corporal o tejido corporal, se liberan los compuestos inmovilizados de manera reversible. Por consiguiente, los dispositivos médicos recubiertos actúan como dispositivos de suministro de fármacos que eluyen el medicamento, según lo cual se puede controlar la cinética de suministro de fármacos, proporcionando una liberación inmediata o un suministro de fármacos controlado, retardado o prolongado, por ejemplo. Las tecnologías de recubrimiento de dispositivos médicos son conocidas para el experto en la materia.

25 La composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para diagnóstico o para aplicaciones terapéuticas. Para aplicaciones de diagnóstico, el compuesto de la fórmula (I) puede estar presente en una forma etiquetada, por ej., en una forma que contiene un isótopo, por ej., un isótopo radiactivo o un isótopo que se puede detectar por resonancia magnética nuclear. Una aplicación terapéutica preferida es, en el caso de una aplicación tópica, la prevención, alivio y tratamiento de soriasis y dermatitis, mientras en el caso de una aplicación sistémica, la prevención, alivio y tratamiento de la regeneración de tejido conjuntivo en reestenosis.

35 Las concentraciones de los compuestos de esta invención en la composición farmacéutica pueden variar. La concentración dependerá de factores tales como la dosis total del fármaco que se tiene que administrar, las características químicas (por ej., hidrofobicidad) de los compuestos empleados, la vía de administración, la edad, peso corporal y síntomas de un paciente. Los compuestos de esta invención se proporcionan típicamente en una disolución tampón fisiológica acuosa que contiene aproximadamente 0,1 a 10% p/v de compuesto para administración parenteral. Los intervalos de administración típicos son de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal al día; un intervalo de administración preferido es de aproximadamente 0,01 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal al día y preferiblemente aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg una vez a cuatro veces al día. Una dosis del fármaco preferida que se tiene que administrar es probable que dependa de variables tales como el tipo y la extensión del progreso de la enfermedad o afección, el estado de salud global del paciente particular, la relativa eficacia biológica del compuesto seleccionado y la formulación del excipiente del compuesto y su vía de administración.

El método de síntesis mejorado según la presente invención se debería explicar además por la siguiente figura y ejemplo, que no debería, sin embargo, limitar el contenido de la presente invención.

50 La Figura 1 muestra una realización preferida del procedimiento según la presente invención. El compuesto de indolocarbazol K-252a se hace reaccionar con un  $\alpha$ -metoxi- $\omega$ -1H-imidazol-carboxamida polietilenglicol (mPEG-NH-CO-Im) para proporcionar un conjugado de metoxipolietilenglicol de K-252a según la invención. En este compuesto preferido de la invención el metoxi-polietilenglicol está unido mediante enlaces covalentes al compuesto de K-252a activo vía la estructura cíclica oxazolidindiónica de 5 miembros.

55 La Figura 2 muestra el espectro RMN de  $^1\text{H}$  del polímero mPEG-NH-CO-Im activado en disolvente DMSO-d<sub>6</sub> en un campo magnético de 400 MHz.

La Figura 3 muestra el espectro ESI-MS de mPEG-NH-CO-Im en el intervalo 500-1.400 m/z usando ionización por electropulverización de trampa de iones de infusión directa.

La Figura 4 muestra el espectro RMN de  $^1\text{H}$  del conjugado polimérico K-252a de la Fig. 1 en disolvente DMSO- $d_6$  a 400 MHz.

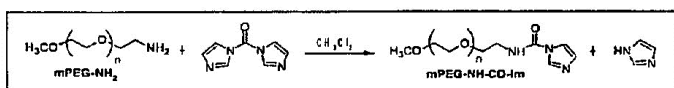
La Figura 5 muestra el espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  del conjugado polimérico K-252a de la Fig. 1 en disolvente DMSO- $d_6$  a 400 MHz.

- 5 La Figura 6 muestra el espectro ESI-MS del conjugado polimérico K-252a de la Fig. 1 en el intervalo 500-1.400 m/z usando ionización por electropulverización de trampa de iones de infusión directa.

La Figura 7 muestra la curva de inhibición del conjugado polimérico K-252a de la Fig. 1 frente a TrkA.

## Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de  $\alpha$ -metoxi- $\omega$ -1H-imidazol-carboxamida polietilenglicol (mPEG-NH-CO-Im)



15 En un matraz redondo de 500 ml de volumen, se disolvieron 35,0 g de mPEG-NH<sub>2</sub> (PM 1.892) (ensayo 96%, 17,76 mmoles) en 85 ml de diclorometano en atmósfera de nitrógeno. Se retiró el disolvente a presión reducida y se secó el compuesto mediante bomba mecánica durante dos horas. Después se disolvió el sustrato en 150 ml de diclorometano en atmósfera de nitrógeno y se transfirió la disolución en un matraz redondo de tres bocas de 2 l de volumen.

Se añadieron 4,80 g de 1,1-carbonildiimidazol (ensayo 90%, 26,64 mmoles) a la disolución a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno y se comprobó por cromatografía TL (eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 90:10). La TLC se trató con disolución de ninhidrina para seguir la presencia del grupo amina primaria (color violeta).

- 20 Se completó la reacción en dos horas. Se enfrió la mezcla a 0°C y se precipitó el producto sólido por adición lenta de dietil éter (700 ml en 60 min) con agitación vigorosa. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 0°C y se añadieron 300 ml más de dietil éter. Se filtró el producto por un embudo de filtro de disco de vidrio sinterizado, se lavó con 100 ml de dietil éter y se secó a vacío. Se obtuvieron 34,0 g de sólido blanco seco (rendimiento del 94%).

El producto se caracterizó por RMN de  $^1\text{H}$  y ESI-MS.

- 25 RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 8,24 (m, 1H, CH), 7,69 (m, 1H, CH), 7,27 (s, 1H, NH), 7,02 (s, 1H, CH), 3,55 (m, CH<sub>2</sub> PEG), 3,40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 3,22 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

ESI-MS (Clúster +2) ...944,4; 966,4; 988,5; 1.010,5; 1.032,5... (incremento de masa +47 con respecto al clúster +2 de mPEG-NH<sub>2</sub> ..897,4; 919,4; 941,5; 963,5; 985,5).

Ejemplo 2: Reacción de conjugación polimérica del K-252a para la fabricación de un conjugado oxazolidindiónico.

- 30 El esquema del procedimiento se indica en la Figura 1.

En un matraz redondo de 500 ml de volumen se disolvieron 33,0 g de mPEG-NH-CO-Im (16,00 mmoles) en 85 ml de diclorometano en atmósfera de nitrógeno. Se retiró el disolvente a presión reducida y se secó el compuesto mediante bomba mecánica durante dos horas.

- 35 En un reactor de 2 l de volumen provisto de unidad de termocriostato, agitador mecánico y termómetro, se disolvieron 6,21 g de K-252a (ensayo 98%, 13,29 mmoles) en 1,85 l de diclorometano en atmósfera de nitrógeno y se enfrió la disolución a 0°C. Se añadieron 0,53 g de hidruro de sodio (ensayo 60%, 13,29 mmoles) en atmósfera de nitrógeno y se agitó la mezcla durante 10 minutos. Se disolvió el mPEG-NH-CO-Im seco en 90 ml de diclorometano y se añadió la disolución a la mezcla de K-252a and NaH en diclorometano a 0°C en atmósfera de nitrógeno. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 0°C, después se calentó a 25°C y se mantuvo con agitación a esta temperatura durante 10 minutos.

- 40 Se analizó la mezcla de reacción por HPLC para evaluar la conversión de K-252a y la relación de los compuestos en la mezcla. Después de 10 minutos a 25°C se añadieron 3,60 g de 1,1-carbonildiimidazol (ensayo 90%, 19,93 mmoles) a la mezcla de reacción y se agitó la disolución a 25°C durante 30 minutos. Se analizó la mezcla de reacción por HPLC para verificar la conversión del subproducto amida (conjugado de mPEG por el resto carboxílico en la posición 9 de K-252a) en el conjugado oxazolidindiónico deseado. Se neutralizó la mezcla de reacción con ácido fórmico (ensayo 98%) a pH 6 final (aproximadamente 2 ml, 53 mmoles).

Se retiró el disolvente a presión reducida a 25°C y se obtuvieron 44,0 g de producto bruto amarillo claro.

La pureza de HPLC del conjugado en el producto bruto estaba por encima de 90%. El contenido del producto deseado en la mezcla bruta es aproximadamente 65-70% p/p.

Ejemplo 3: Purificación del conjugado oxazolidindiónico de K-252a por cromatografía por desorción súbita de fase inversa.

- 5 La mezcla bruta obtenida en la etapa de conjugación del Ejemplo 2 se purificó por cromatografía por desorción súbita de fase inversa. Se usó un sistema Biotage Horizon provisto de un cartucho Flash 65iM KP-C18. Se dividió el lote de producción en 15 alícuotas de 3,0 g cada una. Las alícuotas se trataron por separado.

10 Se acondicionó en primer lugar una columna C18 con 200 ml de disolvente aplicando el siguiente gradiente: de 100% de acetonitrilo a acetonitrilo/agua 40:60 y después con 200 ml de acetonitrilo/ formiato de amonio 5 mM pH 3,5 40:60, en condiciones isocráticas.

Se disolvieron 3,0 g de producto bruto en 3,0 ml de N,N-dimetilformamida y se cargó la disolución en la columna. Se llevó a cabo la purificación por elución isocrática con acetonitrilo/ formiato de amonio 5 mM pH 3,5 40:60. Se analizaron las fracciones individuales recogidas por HPLC y las fracciones puras combinadas. Se retiró el disolvente a presión reducida a 25°C y se obtuvieron aproximadamente 2 g de producto húmedo puro.

- 15 Se purificó cada alícuota siguiendo el primer procedimiento y finalmente cada fracción de producto húmedo puro se disolvió en 10 ml de diclorometano y después se combinaron. Se secó la disolución sobre sulfato de sodio. Se separó el sólido por filtración y se retiró el disolvente a presión reducida a 25°C.

20 Se analizó el producto sólido obtenido por espectroscopía de RMN y se detectó aproximadamente 1 moleq de formiato de amonio. Para retirar esta sal se disolvió el producto en 50 ml de diclorometano y se eluyó sobre una almohadilla de gel de sílice humedecida con diclorometano. Se recuperó el producto por elución con 700 ml de la mezcla de disolventes diclorometano/metanol 9:1. Se recogió el eluido y se retiró el disolvente a presión reducida a 25°C. Se disolvió de nuevo el producto en 80 ml de diclorometano y se precipitó a 0°C con agitación vigorosa por adición de 500 ml de dietil éter para obtener un producto sólido. Se filtró el producto por un embudo de filtro de disco de vidrio sinterizado, se lavó con 100 ml de dietil éter y se secó a vacío durante 16 h.

- 25 Se obtuvieron 16,0 g de polvo amarillo claro con un rendimiento total (conjugación + purificación) de 51%.

El producto se caracterizó por RMN, ESI-MS y HPLC. Se determinó el ensayo por RMN usando un patrón interno y correspondió a 101% p/p.

30 RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 9,25 (d, 1H, CH), 8,70 (s, 1H, NH), 8,11 (d, 1H, CH), 7,95 (d, 1H, CH), 7,70 (d, 1H, CH), 7,51 (m, 2H, CH), 7,42 (m, 2H, CH), 7,31 (m, 1H, CH), 5,05 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 3,90-3,40 (m, CH<sub>2</sub> PEG), 3,25 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2,35 (m, 4H, CH<sub>3</sub> + 1h CH<sub>2</sub>).

RMN de <sup>13</sup>C (DMSO- d<sub>6</sub>) δ (ppm): 172,3; 172,0; 153,7; 139,4; 137,5; 133,5; 128,1; 126,2; 124,9; 124,0; 123,2; 122,3; 121,6; 120,8; 120,4; 117,0; 115,4; 113,5; 109,9; 98,4; 90,6; 85,3; 71,8; 70,0; 68,9; 66,3; 58,5; 45,9; 40,0; 23,16.

ESI-MS (Clúster +2) ...1.128,2; 1.150,3; 1.172,3; 1.194,3; 1.216,3... (incremento de masa +230,8 con respecto al clúster +2 de mPEG-NH<sub>2</sub> ..897,4; 919,4; 941,5; 963,5; 985,5).

- 35 Masa exacta: la discrepancia exacta de masa entre espectro registrado y espectro teórico corresponde a 2 ppm. Por lo tanto, el compuesto polimérico resultante presenta una pureza de al menos aproximadamente 98%.

Ejemplo 4: Purificación del conjugado oxazolidindiónico de K-252a por cromatografía por desorción súbita de fase normal.

- 40 Se realizó un procedimiento sintético como se describe en los Ejemplos 1 y 2 anteriores y en este periodo sintético se obtuvieron 21,7 g de producto bruto.

45 La mezcla bruta obtenida de dicha etapa de conjugación se purificó por cromatografía por desorción súbita de fase normal usando un Sistema Biotage Horizon provisto de un cartucho SNAP empaquetado con 340 g de KP-SIL (Sílice) (tamaño 71 x 168 mm). Se dividió el producto bruto en dos alícuotas que se purificaron por separado una vez cada una (cada alícuota respectivamente 10,86 g y 10,8 g del bruto). Se equilibró el cartucho SNAP con 940 ml de diclorometano/metanol 96:4 v/v. El caudal fue 65 ml/min. Se realizó la carga de muestra usando un cartucho *samplet* SNAP pre-empaquetado (34 g) disolviendo material bruto en 10 ml de diclorometano, aplicando la disolución al cartucho *samplet* e insertando el *samplet* en el cartucho SNAP.

Se eluyó el cartucho SNAP, a un caudal de 65 ml/min, con:

- 50 - 705 ml de diclorometano/metanol 96:4 v/v;  
- 1.881 ml de diclorometano/metanol 93:7 v/v;

- 942 ml de diclorometano/metanol 85:15 v/v.

Los primeros 999 ml de disolvente eluido se enviaron al desecho, después se recogió el disolvente eluido en fracciones de 111 ml de volumen.

5 Se analizaron las fracciones individuales recogidas por HPLC y se combinaron las fracciones que contenían el compuesto producto conjugado con pureza HPLC >98% (fracciones puras). La alícuota residual de 10,8 g del material de mezcla bruta de la etapa de conjugación se purificó de manera análoga. Las fracciones seleccionadas de las purificaciones de las dos alícuotas de mezcla bruta se combinaron, se eliminó el disolvente a presión reducida a 25°C a sequedad, proporcionando 8,11 g de producto conjugado, que se disolvió de nuevo en 29 ml de diclorometano, se enfrió a 2°C y se precipitó con agitación vigorosa por adición de 150 ml de dietil éter en 10 minutos. Se agitó la mezcla a 2°C durante 15 minutos, después se añadieron 225 ml de dietil éter. Se aisló el sólido precipitado por filtración por filtro de vidrio sinterizado (G4) y se secó a vacío a 25°C durante 16 h para proporcionar 6,95 g de objeto de ensayo como un sólido blanco a ligeramente amarillo. La pureza, determinada por análisis de HPLC fue 99%.

**Ejemplo 5: Procedimiento sintético para el conjugado oxazolidindiónico de K-252a.**

15 1) Síntesis de MeO-PEG-NH-CO-Im

Se disolvió MeO-PEG-NH<sub>2</sub> (PM 1.892, 8,06 g) en diclorometano (25 ml) en atmósfera de nitrógeno y se retiró el disolvente por destilación a una presión reducida a 40°C. El resto (MeO-PEG-NH<sub>2</sub>) se secó después a vacío (< 4 kPa (40 mbar)) a 40°C durante más de 2 horas.

20 Se disolvió el MeO-PEG-NH<sub>2</sub> seco (de antes) en diclorometano (35 ml) a 25°C en atmósfera de nitrógeno y se añadió 1,1'-carbonildiimidazol (1,02 g) a la disolución y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante más de 2 horas. (Cromatografía de Pariónico (IPC, por sus siglas en inglés): ≥ 95% de conversión).

25 Se enfrió la mezcla de reacción a 0°C, después se añadieron 230 ml de dietil éter durante 1 hora con agitación vigorosa. Se agitó la mezcla durante 30 min a 0°C y se añadieron 69 ml más de dietil éter durante 25 min. Se lavó la torta de masa filtrante dos veces con dietil éter (23 ml) y se secó a vacío a máx 40°C a peso constante para conseguir 8,25 g de MeO-PEG-NH-CO-Im como un sólido blanco.

2) Reacción de conjugación polimérica

Se disolvió MeO-PEG-NH-CO-Im (72,0 g) en diclorometano (185 ml) en atmósfera de nitrógeno y se retiró el disolvente por destilación a presión reducida a 40°C. Se secó el residuo a vacío (< 4 kPa (40 mbar)) a 40°C > 2 horas.

30 Se disolvió K252a (13,11 g) en diclorometano (3.920 ml) y se enfrió después la disolución a 0°C. Se añadió hidruro de sodio (1,17 g de 60%) poco a poco.

Se disolvió el MeO-PEG-NH-CO-Im seco en diclorometano (140 ml) y se añadió la disolución a < 5°C a la mezcla de reacción de K252a y se agitó la mezcla durante > 30 min a 0°C. Se calentó después la disolución de mezcla a 25°C y se mantuvo con agitación a esta temperatura durante 10 minutos. (IPC 1: conversión de K252a > 96%).

35 Se añadió 1,1'-carbonildiimidazol (7,11 g) a la mezcla de reacción y se agitó la disolución a 25°C durante > 30 minutos (IPC 2: proporción producto bruto: amida > 80:20).

Se añadió ácido fórmico (5 ml) para ajustar a pH 6 de la mezcla de reacción. Se retiró el disolvente por destilación a 25°C a presión reducida y se secó el residuo a vacío a 25°C a peso constante.

3: Purificación y aislamiento del conjugado polimérico.

40 Se disolvió la mezcla bruta (81 g) en 325 ml de diclorometano a < 35°C durante más de 15 minutos y se filtró por un lecho de Celite (3 cm). Se lavó el Celite con 81 ml de diclorometano. Se elimina el disolvente por destilación a presión reducida a < 35°C y se secó a peso constante bajo 35°C para conseguir 77,0 g de material sólido. Se disolvió el material sólido en 770 ml de diclorometano.

45 Se purificó el material bruto del Ejemplo 5.2 en un sistema HPLC preparativa Knauer usando cartuchos Flash KP-SIL 75 l (75x300 mm, 800 g de sílice) de Biotage. Previamente a la aplicación de la disolución de alimentación se purgaron los cartuchos con 1,5 l de n-heptano y se equilibró con 3 l de DCM:MeOH=96:4 (v:v). Para cada proceso, se inyectaron 200 ml de la disolución de alimentación DCM:MeOH = 96:4 (v:v) descrita anteriormente (Carga 20 g) y se inició la elución con un flujo de 185 ml/min y el gradiente descrito anteriormente.

Minutos	% MeOH
0,00	4

(continuación)

Minutos	% MeOH
8,30	4
80,10	15
80,10	50
108,00	50

Cada cartucho se usó para un proceso. Se eluyó el producto entre 25 y 90 min. Se recogieron las fracciones se analizaron y se juntaron según su pureza (IPC: > 98% a/a).

5 Se retiró después el disolvente a presión reducida a 35°C. Se secaron los sólidos a peso constante a vacío a 35°C para obtener material bruto (37,92 g). Se disolvió el material en 140 ml de diclorometano y se enfrió a 2°C. Se añadieron 700 ml de dietil éter a 2°C y se agitó durante > 15 minutos. Se añadieron 1.050 ml de dietil éter a 2°C. Se filtró la suspensión vía un filtro de succión. Se lavó la torta de masa filtrante con las aguas madres y se secó a peso constante para obtener 32,6 g de fármaco purificado. La pureza obtenida según un análisis de HPLC fue 98,99%.

10 Los ejemplos adicionales describen diversos estudios realizados con el compuesto polimérico conjugado de indolocarbazol de la invención, en particular con el conjugado polimérico obtenido por el procedimiento sintético de la invención, por ej., como se describe en los Ejemplos 1-5. El compuesto conjugado ensayado (también denominado "objeto de ensayo") es el conjugado oxazolidindiónico de K252a con PEG (1.892 de PM).

Ejemplo 6: Evaluación *in vitro* de IC<sub>50</sub> frente a TrkA para el conjugado oxazolidindiónico de K-252a.

15 El propósito de este estudio fue medir IC<sub>50</sub> para el conjugado del Ejemplo 3 frente a TrkA cinasa. El compuesto de ensayo se disolvió en dimetil-sulfóxido (DMSO) y después se diluyó además la disolución 25 veces con tampón de ensayo para preparar la disolución de compuesto de ensayo final. Se ensayó el conjugado a las siguientes concentraciones: 30.000 nM, 10.000 nM, 3.000 nM, 1.000 nM, 300 nM, 100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM y 1 nM.

Se preparó compuesto de referencia (Estaurosporina) control del ensayo de manera similar al método usado para la preparación del compuesto de ensayo.

20 El procedimiento de ensayo se representa por un Ensayo de Desplazamiento de Movilidad Off-chip (MSA, por sus siglas en inglés) y se indica a continuación:

25 1) Los 5 µl de disolución de compuesto x4, 5 µl de sustrato x4 (CSKtide 1.000 nM)/ATP (75 µM)/disolución de metal (Mg 5 mM) y 10 µl de disolución de cinasa x2 se prepararon con tampón de ensayo [HEPES 20 mM (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfónico), Tritón X-100 al 0,01%, DTT 2 mM (1,2-ditio-treitol), pH 7,5] y se mezcló y se incubó en un pozo de microplaca de 384 pozos de polipropileno durante 1 ó 5 hora(s)\* a temperatura ambiente. (\*; depende de cinasa).

2) Se añadieron 60 µl de Tampón de Terminación (Auxiliar de Identificación de MSA QuickScout; Carna Biosciences) al pozo.

30 3) La mezcla de reacción se aplicó a sistema LabChip3000 (Caliper Life Science) y se separó el producto y los picos de péptidos sustratos y se cuantificaron.

4) Se evaluó la reacción de la cinasa por la proporción de producto calculada a partir de las alturas de los picos de producto (P) y péptidos (P/(P+S)) sustrato (S).

35 El valor de la lectura de control de la reacción (mezcla de reacción completa) se fijó como una inhibición al 0% y el valor de la lectura de fondo (Enzima (-)) se fijó como una inhibición al 100%, después se calculó el porcentaje de inhibición de cada disolución de ensayo. Se calculó el valor de IC<sub>50</sub> a partir de curvas de concentración frente a % de inhibición por ajuste a una curva logística de cuatro parámetros. Se evaluó la reacción de la cinasa por la proporción de producto calculada a partir de las alturas de los picos de producto (P) y péptidos (P/(P+S)) sustrato (S).

El valor de IC<sub>50</sub> del conjugado frente a TrkA fue 202 nM, el correspondiente valor IC<sub>50</sub> de compuesto de referencia (Estaurosporina) frente a TrkA fue 0,372 nM. Estos resultados se resumen en la Figura 7.

40 Ejemplo 7: Estudio de toxicidad dérmica aguda en ratas.

Se investigó la toxicidad aguda del conjugado del Ejemplo 3 después de la administración de una sola dosis dérmica a la rata.

Se administró una sola dosis de 2.000 mg/kg a un grupo de animales 5 machos y 5 hembras durante un periodo de 24 horas. El día antes de la dosis programada se eliminó el pelo de las superficies dorsales del tronco por un área estimada de 10% de la superficie corporal total. Se tuvo cuidado para evitar cualquier daño o abrasión a la piel. El objeto de ensayo se administró por vía tópica a un volumen de la dosis de 4 ml/kg de peso corporal, justo después de su preparación. La alícuota requerida del objeto de ensayo formulado se esparció uniformemente sobre una gasa que medía 2,5 x 2,5 cm. El parche de gasa se puso después sobre la piel del animal, con el objeto de ensayo en contacto directo con la piel. Se puso una tira de película sintética sobre el lado tratado y se mantuvo en el sitio el conjunto completo envolviendo el tronco del animal con una longitud de venda adhesiva elástica. Después de un periodo de 24 horas, se retirará el apósito de cinta. Se lavó después cuidadosamente el sitio de piel tratada sin ningún objeto de ensayo restante usando agua tibia. Por todo el estudio, se comprobarán todos los animales dos veces a diario. Se examinaron en los animales signos de reacción a tratamiento en dosificación, aproximadamente 30 min, 2 y 4 horas después de dosificación el día 1, después a diario durante un total de 14 días. Cada animal se pesó el día de asignación al estudio, el día de dosificación (día 1) y los días 8 y 15. Después de un periodo de 14 días se sacrificaron todos los animales y se sometieron a un examen de necropsia.

No tuvo lugar mortalidad y no se observaron signos clínicos en animales macho o hembra durante el estudio. Los cambios en el peso corporal observados en los animales al final del estudio estuvieron dentro del intervalo esperado para esta especie y la edad de los animales. No se observaron anomalías internas en la necropsia en los animales a la terminación del estudio. No se observaron anomalías en el sitio tratado.

Estos resultados indican que el compuesto de ensayo no presenta efecto tóxico en la rata después de la exposición dérmica durante un periodo de 24 horas a un nivel de 2.000 mg/kg. La ausencia de mortalidad demuestra que el LD<sub>50</sub> es mayor que 2.000 mg/kg.

Ejemplo 8: Estudio de toxicidad dérmica de 13 semanas en ratas seguido por un periodo de recuperación de 4 semanas.

El propósito de este estudio fue evaluar la toxicidad del objeto de ensayo en ratas después de administración dérmica diaria (estimulación de 6 horas) durante un periodo de 13 semanas e investigar la posible recuperación de cualquier potencial efecto relacionado con el tratamiento durante un periodo de 4 semanas consecutivas. También se evaluó el perfil toxicocinético.

Tres grupos, cada uno de ratas Sprague Dawley 10 machos y 10 hembras (cf. Tabla 1: macho numerado con números pares, hembra numerada con números impares) recibieron el objeto de ensayo por aplicación dérmica a dosis de 0,5; 2,5 y 5 mg/kg/día durante 13 semanas consecutivas (Tabla 1: números de grupo 2-4). Un cuarto grupo constituido de manera similar recibió el vehículo solo (agua purificada) y actuó como un control (Tabla 1: número de grupo 1). Se incluyeron cinco animales adicionales para cada sexo en los grupos superiores y de control (Tabla 1: números de grupo 4 y 1, respectivamente), para valoración de la recuperación. Además, se trataron 3 grupos satélite para la toxicocinética, que incluye 9 machos y 9 hembras (Tabla 2: números de grupo 5-8, respectivamente) y 1 grupo de control, que incluye 3 machos y 3 hembras (Tabla 2: número de grupo 5), como los grupos principales para evaluaciones toxicocinéticas.

La identificación de los grupos y los números de los animales asignados al tratamiento se resumen a continuación en la Tabla 1 y 2:

Tabla 1 (Grupos principales):

40

Tabla 1

Número Grupo	Tratamiento (mg/kg/día)	Nivel	Números de rata			
			Fase principal		Fase de recuperación	
			M (par)	H (impar)	M (par)	H (impar)
1	0	Control	2-20	1 -19	22-30	21-29
2	0,5	Bajo	32-50	31 -49		
3	2,5	Medio	52-70	51-69		
4	5	Alto	72-90	71 -89	92-100	91-99



Tabla 2 (Grupos satélite):

Tabla 2

Número Grupo	Dosis (mg/kg/día )	Tratamiento/ Nivel	Números de Rata	
			M (par)	H (impar)
5	0	Control	102-106	101-105
6	0,5	Bajo	108-124	107-123
7	2,5	Medio	126-142	125-141
8	5	Alto	144-160	143-159

- 5 Se examinaron los sitios de tratamiento cada día, aproximadamente 3 horas después del comienzo de la dosificación. La irritación de los sitios, cuando se compara con la piel no tratada adyacente, se asignó a un valor numérico según la tabla a continuación:

**Formación de eritema y escara Valor**

No eritema	0
Eritema muy ligero (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema moderado a intenso	3
Eritema intenso (color rojo remolacha) a formación de escara que evita la graduación de eritema	4

**Formación de edema Valor**

No edema	0
Edema muy ligero (apenas perceptible)	1
Edema ligero (bordes de área definidos por elevación clara)	2
Edema moderado (elevado aproximadamente un milímetro)	3
Edema intenso (elevado más de un milímetro y extensión más allá del área de estimulación)	4

Resultados

- 10 No tuvo lugar mortalidad relacionada con el tratamiento durante el estudio (una hembra del grupo de dosis alta murió el Día 40 del estudio) y no se observaron signos clínicos relacionados con el tratamiento. No se registraron diferencias importantes en el peso corporal y el consumo de alimento de los animales tratados permaneció comparable a los controles durante todo el estudio.

- 15 No se observaron signos de irritación en los sitios tratados (el índice de irritación fue 0). No se detectaron lesiones relacionadas con el tratamiento en el examen oftálmico realizado al final del periodo de tratamiento.

Desde un punto de vista hematológico, la leucopenia observada en animales del grupo de dosis alta y en hembras del grupo de dosis media mostró una reversibilidad parcial al final del periodo de recuperación. No se observó otro cambio de significación toxicológica.

No se observaron cambios de significación toxicológica tanto de química clínica como de análisis de orina.

El peso corporal terminal fue comparable entre grupos de control y tratados. No se observaron cambios en los pesos de los órganos absolutos y relativos de significación toxicológica.

No se observaron cambios relacionados con el tratamiento después de observaciones macroscópicas y microscópicas.

5 En lo que se refiere a la toxicocinética, el Día 1, los niveles en plasma de objeto de ensayo estuvieron en general por debajo de los LIDC (límites inferiores de cuantificación, = 49,9 ng/ml) en machos y hembras que recibieron 0,5; 2,5 y 5 mg/kg/día del objeto de ensayo, cuando sólo los animales individuales mostraban ocasionalmente valores ligeramente >LIDC entre 2 y 8 horas post-dosis. Los valores medidos no eran proporcionales al nivel de la dosis.

10 Se observaron resultados similares en las semanas 4 y 13, cuando se detectó una menor incidencia de absorción. Esta fue evidente en particular la semana 4 en los machos, que mostraron valores ocasionales ligeramente >LIDC entre 6 y 8 horas post-dosis sólo en animales que recibieron 5 mg/kg/día del objeto de ensayo y la semana 13 en las hembras (valores ligeramente > LIDC entre 4 y 8 horas post-dosis sólo a 5 mg/kg/día).

15 No se midieron niveles detectables para animales de grupo tratados con el vehículo solo. Sobre la base de los resultados anteriores, no tuvo lugar acumulación después de la administración diaria durante un periodo de 13 semanas.

#### Conclusiones

20 No se observaron efectos adversos a cualquiera de los niveles de dosis del objeto de ensayo investigados (es decir, 0,5; 2,5 y 5 mg/kg/día). La ligera leucopenia observada en los animales tratados cuando se compara con los controles, no se consideró de importancia toxicológica ya que fue de pequeña magnitud, en general no relacionada con la dosis y no soportada por ningún cambio microscópico. Por lo tanto, se consideró que la alta dosis de 5 mg/kg/día es el Nivel de Efecto Adverso No Observado (NOAEL, por sus siglas en inglés) para el objeto de ensayo después de administración dérmica diaria a ratas durante un periodo de 13 semanas.

Los resultados de análisis de muestras de plasma mostraron que el objeto de ensayo sólo se absorbe mínimamente por la ruta dérmica.

25 Ejemplo 9: Estudio de toxicidad dérmica de 13 semanas en conejos seguido por un periodo de recuperación de 4 semanas.

La toxicidad del objeto de ensayo se investigó en conejos después de administración dérmica diaria a niveles de la dosis de 0,5; 2,5 y 5 mg/animal/día durante un periodo de 13 semanas y recuperación de cualquier potencial efecto relacionado con el tratamiento durante un periodo de 4 semanas consecutivas.

30 Tres grupos, cada uno de conejos Exentos de Patógenos Específicos Blancos (SPF, por sus siglas en inglés) de Nueva Zelanda 6 machos y 6 hembras (cf. Tabla 3: macho numerado con números pares, hembra numerada con números impares), recibieron el objeto de ensayo por aplicación dérmica a dosis de 0,5; 2,5 y 5 mg/animal/día durante 13 semanas consecutivas (Tabla 3, números de grupo 2-4, respectivamente). Un cuarto grupo constituido de manera similar recibió el vehículo solo (agua purificada) y actuó como un control (Tabla 3, número de grupo 1). Los grupos de control y de dosis alta (Tabla 3, números de grupo 4 y 1, respectivamente), incluidos 3 animales  
35 adicionales por sexo para valoración de la recuperación.

La identificación del grupo y el tratamiento se resumen en la Tabla 3 a continuación:

Tabla 3

Número Grupo	Tratamiento (mg/animal/día )	Nivel	Números de conejo			
			Fase principal		Fase de recuperación	
			M (par)	H (impar)	M (par)	H (impar)
1	0	Control	2-12	1-11	14-18	13-17
2	0,5	Bajo	20-30	19-29		
3	2,5	Medio	32-42	31-41		
4	5	Alto	44-54	43-53	56-60	55-59

Las siguientes investigaciones se realizaron: signos clínicos a diario, peso corporal, consumo de alimento, observaciones macroscópicas de los sitios de tratamiento, investigaciones patológicas clínicas, peso corporal terminal, peso de órganos, observaciones macroscópicas post mortem y examen de histología patológica. Se tomaron muestras de sangre de cada animal el Día 1 y la Semana 13 para evaluaciones toxicocinéticas.

- 5 Se examinaron los sitios de tratamiento, cada día, aproximadamente 3 horas después del comienzo de dosificación. La irritación de los sitios, cuando se compara con la piel no tratada adyacente, se asignó a un valor numérico según la tabla a continuación:

<b>Formación de eritema y escara</b>	<b>Valor</b>
No eritema	0
Eritema muy ligero (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema moderado a intenso	3
Eritema intenso (color rojo remolacha) a formación de escara que evita la graduación de eritema	4

<b>Formación de edema</b>	<b>Valor</b>
No edema	0
Edema muy ligero (apenas perceptible)	1
Edema ligero (bordes de área definidos por elevación clara)	2
Edema moderado (elevado aproximadamente un milímetro)	3
Edema intenso (elevado más de un milímetro y extensión más allá del área de estimulación)	4

10 Resultados

No tuvo lugar mortalidad relacionada con el tratamiento durante el estudio (un macho del grupo de control de recuperación se sacrificó de manera humanal Día 29 del estudio) y no se observaron signos clínicos relacionados con el tratamiento.

No se observaron signos de irritación después de observaciones macroscópicas de sitios tratados.

- 15 No se registraron diferencias importantes en el peso corporal durante el estudio y el consumo de alimento de los animales tratados permaneció comparable a los controles.

En el examen oftálmico realizado al final del periodo de tratamiento, no se detectaron lesiones relacionadas con el tratamiento.

Para química hematológica y clínica, no se registraron cambios de significación toxicológica.

- 20 En lo que se refiere a la toxicocinética, la semana 1, los niveles en plasma del objeto de ensayo fueron ligeramente >LIDC (límite inferior de cuantificación, = 51,30 ng/ml) en la mayoría de los machos que recibieron 2,5 mg/kg/día del objeto de ensayo y en hembras que recibieron 5 mg/kg/día. Sólo los animales macho individuales dosificados a 0,5 y 5 mg/kg/día mostraron ocasionalmente valores ligeramente >LIDC. La incidencia de absorción fue ligeramente mayor en machos comparado con las hembras. La absorción no fue proporcional al nivel de la dosis.

- 25 También se observó absorción muy baja la semana 13. Los valores >LIDC se indicaron en general entre 2 y 24 horas post-dosis. La absorción fue ligeramente mayor en hembras que en machos.

No se midieron niveles detectables para animales tratados con el vehículo solo.

Sobre la base de los resultados anteriores, no tuvo lugar acumulación después de la administración diaria durante un periodo de 13 semanas.

El peso corporal terminal fue comparable entre los grupos de control y tratados y no se observaron cambios en el peso de órganos absoluto y relativo de significación toxicológica.

Después de observaciones macroscópicas y microscópicas no se observaron cambios relacionados con el tratamiento.

5 Conclusiones

No se observaron efectos adversos a cualquiera de los niveles de dosis del objeto de ensayo investigado (es decir, 0,5; 2,5 y 5 mg/animal/día). Por lo tanto, se considera que la dosis alta de 5 mg/kg/día es el Nivel de Efecto Adverso No Observado (NOAEL) para el objeto de ensayo después de administración dérmica diaria a conejos durante un periodo de 13 semanas.

10 Los resultados de análisis de muestras en plasma mostraron que el objeto de ensayo sólo se absorbe mínimamente por la ruta dérmica.

Ejemplo 10: Estudio de toxicidad intravenosa aguda en ratas.

15 La toxicidad aguda del conjugado del Ejemplo 3 se investigó después de administración intravenosa (10 ml/kg en disolución salina fisiológica) de una sola dosis a ratas Sprague Dawley seguido por un periodo de observación de 14 días.

20 Se administró a un solo grupo de animales de 5 machos y 5 hembras una dosis de 2.000 mg/kg. Se administró a los animales la dosis con el objeto de ensayo formulado al nivel seleccionado, justo después de su preparación, por inyección en la vena de la cola usando una aguja hipodérmica unida a una jeringa de capacidad adecuada, a un volumen de dosis de 10 ml/kg de peso corporal. Durante todo el estudio, se comprobaron todos los animales dos veces al día.

Se examinaron en los animales los signos de reacción a tratamiento en dosificación, aproximadamente 30 min, 2 y 4 horas después de dosificación el día 1, después a diario durante un total de 14 días. Cada animal se pesó el día de asignación al estudio, el día de dosificación (día 1) y los días 2, 8 y 15. Se sacrificaron todos los animales al final del periodo de observación y se sometieron a examen de necropsia.

25 No tuvo lugar mortalidad en animales tanto macho como hembras. El signo clínico observado en todos los animales el día de dosificación fueron actividad y piloerección reducidas. En una sola hembra se observó pérdida de pelo en el dorso durante la segunda semana del estudio.

30 Los cambios en el peso corporal observados al final del estudio estuvieron dentro del intervalo esperado para esta cepa y edad de los animales. No se detectaron anomalías internas en ningún animal en el examen de la necropsia. No se observaron anomalías en el sitio de la inyección.

Estos resultados indican que el conjugado no presentó efecto tóxico en la rata después de la administración intravenosa única a un nivel de la dosis de 2.000 mg/kg de peso corporal. Sólo se observaron signos clínicos minoritarios en los animales. El objeto de ensayo fue tolerado de manera local cuando se inyectó en la vena de la cola al nivel de dosis ensayado.

35 Ejemplo 11: Mutación en células de linfoma de ratón L5178Y TK<sup>±</sup> (método de fluctuación).

Se examinó en el objeto de ensayo la actividad mutagénica por ensayo para la inducción de mutantes resistentes a 5-trifluorotimidina en células L5178Y de linfoma de ratón después de tratamiento *en vitro*, en ausencia y presencia de activación metabólica S9, usando un método de fluctuación. Este método puede detectar mutación de genes, efectos clastogénicos y aneugénicos.

40 El método de ensayo de mutación usado en este estudio está basado en la identificación de colonias L5178Y que se han hecho resistentes a trifluorotimidina (TFT) análogo de timidina tóxica. Este análogo se puede metabolizar por la enzima timidina cinasa (TK, por sus siglas en inglés) e nucleósidos, que se usan en síntesis de ácidos nucleicos dando como resultado la muerte de células competentes de TK.

45 Las células deficientes en TK, que se presume que surgen por mutaciones en el gen TK, no pueden metabolizar trifluorotimidina y así sobreviven y crecen en su presencia.

En las células L5178Y de linfoma de ratón, el gen que se codifica para la enzima TK está situado en el cromosoma 11. Las células que son heterocigóticas en el sitio TK (TK<sup>±</sup>) pueden experimentar una mutación directa de una sola etapa para el genotipo TK<sup>-</sup> en que queda poca actividad TK o ninguna.

50 Las células usadas, L5178Y TK<sup>±</sup>, proceden de uno de los dos clones originados de un tumor tímico inducido en un ratón DBA/2 por metilcolantreno. El uso del sistema de mutación TK en células de linfoma de ratón L5178Y se ha caracterizado y validado (Clive D, Johnson KO, Spector JF, Batson AG, Brown MM. Validation and characterization of the L5178Y/TK<sup>±</sup> mouse lymphoma mutagen assay system. *Mutat Res. En.* 1.979; 59 (1): 61-108.) y está

aceptado por la mayoría de las autoridades reguladoras.

El ensayo de linfoma de ratón produce con frecuencia una distribución de tamaño bimodal de colonias resistentes a TFT denominada pequeña o grande. Se ha evaluado que las mutaciones puntuales y las supresiones en el alelo activo (proceso intragénico) producen colonias grandes. Las colonias pequeñas resultan en parte de lesiones que afectan no sólo al alelo TK activo sino también a genes flanqueadores cuya expresión modula la velocidad de crecimiento de las células.

Se encontró que el objeto de ensayo era soluble en medio completo RPMI 1640 a la concentración de 50,0 mg/ml.

Se realizó un ensayo de citotoxicidad preliminar. Basado en los resultados de solubilidad, se ensayó el objeto de ensayo a un nivel de dosis máximo de 5.000 µg/ml tanto en ausencia como en presencia de metabolismo S9. Se incluyó un amplio intervalo de niveles de dosis inferiores en las series de tratamiento: 2.500, 1.250, 625, 313, 156, 78,1; 39,1 y 19,5 µg/ml.

En ausencia de activación metabólica S9, usando el tiempo de tratamiento corto, se observó ligera reducción de supervivencia relativa a varias concentraciones sin una relación de dosis. Usando el tiempo de tratamiento largo, se observó toxicidad a las dos concentraciones superiores reduciendo la supervivencia relativa a aproximadamente 60% del valor de control negativo concurrente.

En presencia de actividad metabólica S9, no se observó toxicidad importante a cualquier concentración ensayada.

Basado en los resultados de toxicidad obtenidos en la prueba preliminar, se realizaron dos ensayos independientes para mutación para resistencia de 5-trifluorotimidina usando los niveles de dosis descritos en la siguiente tabla 4:

Tabla 4

Nº Ensayo:	S9	Tiempo de Tratamiento (horas)	Nivel de dosis (µg/ml)
1	-/+	3	5.000, 2.500, 1.250, 625 y 313
2	-	24	5.000, 2.500, 1.250, 625 y 313
2	+	3	5.000, 3.571, 2.551, 1.822 y 1.302

No se observaron incrementos importantes en frecuencias mutantes después de tratamiento con el objeto de ensayo, en ausencia o presencia de metabolismo S9.

Se incluyeron tratamientos de control de disolvente y positivo en cada experimento de mutación en ausencia y presencia de metabolismo S9. Las frecuencias mutantes en los cultivos de control de disolvente se encontraron dentro del intervalo normal. Se obtuvieron incrementos notables con los tratamientos de control positivo indicando el funcionamiento correcto del sistema de ensayo.

Se concluyó que el objeto de ensayo no induce mutación en células L5178Y de linfoma de ratón después de tratamiento in vitro en ausencia o presencia de activación metabólica S9, en las condiciones experimentales indicadas.

Ejemplo 12: Ensayo de fotomutagenicidad en bacterias (*S. typhimurium* y *E. coli*)

Se examinó en el objeto de ensayo la actividad fotomutagénica por ensayo de mutación inversa a prototrófica en los organismos procariotas, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, después de exposición a la luz. Se usaron las tres cepas controladoras *S. typhimurium*, TA1537, TA98 y TA100 y la cepa controladora *E. coli*, WP2. Las bacterias, se pusieron en placas conjuntamente con el objeto de ensayo en agar blando, se irradiaron con varias dosis de luz UV. Los procedimientos adoptados se desarrollaron por Ames et al., 1.975 y fueron revisados por Maron y Ames, 1.983.

El objeto de ensayo se usó como una disolución en agua destilada estéril. El objeto de ensayo se ensayó en el ensayo de toxicidad a un nivel de dosis máximo de 5.000 µg/placa y a cuatro concentraciones inferiores espaciadas a intervalos aproximadamente semi-log: 1.580, 500, 158 y 50,0 µg/placa. Se seleccionaron dos dosis UV ampliamente espaciadas para cepa controladora de bacterias sobre la base de la dosis máxima tolerada. No se observó toxicidad importante a ninguna concentración del objeto de ensayo o a cualquier dosis de irradiación UV.

Se realizaron dos experimentos independientes usando el método de incorporación de placas.

El objeto de ensayo se ensayó a un nivel de dosis máximo de 5.000 µg/placa y a cuatro niveles inferiores de la dosis espaciados por diluciones dos veces: 2.500, 1.250, 625 y 313 µg/placa. Se expusieron las placas preparadas a las siguientes dosis UVA y UVB (Tabla 5):

Tabla 5

Cepa controladora	UVA (J/cm <sup>2</sup> )	UVB (J/cm <sup>2</sup> )
TA1537	0,4	-
	0,2	-
	0,1	-
TA98	0,2	-
	0,1	-
	0,05	-
TA100	0,04	-
	0,02	-
	0,01	-
WP2	0,004	0,004
	0,002	0,002
	0,001	0,001

5

#### Resultados

El objeto de ensayo no indujo incrementos de dos veces en el número de colonias revertientes por el efecto UV de fondo a cualquier nivel de dosis del objeto de ensayo, en cualquier cepa controladora, a cualquier dosis de irradiación UV.

#### 10 Conclusiones

Se concluye que el objeto de ensayo no induce mutación inversa en *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli*, cuando se realizó el tratamiento en presencia de luz UV.

Ejemplo 13: Aberraciones cromosómicas en células de ovario de hámster Chino *in vitro* (Ensayo de fotomutagenicidad)

#### 15 En el objeto de ensayo se ensayó la capacidad para ocasionar daño cromosómico en células de ovario de hámster Chino, después de tratamiento *in vitro* en ausencia y presencia de irradiación UVA/UVB.

Se realizó un ensayo para daño cromosómico a niveles de la dosis de 5.000, 2.500, 1.250, 625, 313, 156, 78,1 y 39,1 µg/ml tanto en ausencia como en presencia de luz ultravioleta se emplearon en el ensayo. Se prepararon disoluciones del objeto de ensayo en Disolución de Sales Equilibradas de Hank (HBSS, por sus siglas en inglés). Tanto en ausencia como en presencia de luz UV, las células se trataron durante 3 horas y se usó el tiempo de recogida de 20 horas, que corresponde a ciclo de células de aproximadamente 1,5. El experimento incluyó controles negativos y positivos apropiados. Se prepararon dos cultivos celulares en cada punto de ensayo.

Se seleccionaron niveles de la dosis para la puntuación de aberraciones cromosómicas sobre la base de los tratamientos del objeto de ensayo cuando se determina por la reducción de recuentos celulares al tiempo de la recogida. Puesto que no se observó toxicidad importante por el intervalo de administración completo, los niveles de dosis seleccionados para puntuación fueron 5.000, 2.500 y 1.250 µg/ml tanto en ausencia como en presencia de luz UV. Se puntuaron las aberraciones cromosómicas en un ciento de extensiones de metafase para cada cultivo.

25

Resultados

Después del tratamiento con el objeto de ensayo, no se observó incremento estadísticamente significativo en la incidencia de células que soportan aberraciones, incluyendo y excluyendo deficiencias, comparado con los valores de control importantes, en ausencia o presencia de luz ultravioleta. Se observaron incrementos estadísticamente significativos en el número de células que soportan aberraciones (incluyendo y excluyendo deficiencias) después de tratamiento con los controles positivos Mitomicina-C y 8-Metoxipsoraleno que indican el correcto funcionamiento del sistema de ensayo.

Conclusiones

Sobre la base de estos resultados se concluye que, en las condiciones experimentales indicadas, el objeto de ensayo no induce aberraciones cromosómicas en células de ovario de hámster Chino después de tratamiento *in vitro* en ausencia o presencia de luz UV.

Ejemplo 14: ensayo de fototoxicidad de células Balb/C 3T3 (Absorción Roja Neutra).

La potencial fototoxicidad *in vitro* del objeto de ensayo se evaluó por las mediciones de absorción roja neutra para toxicidad celular en cultivos de células Balb/c 3T3 tratadas con diferentes dosis del objeto de ensayo y se expusieron a irradiación UVA. Se prepararon disoluciones del objeto de ensayo usando Disolución de Sales Equilibradas de Earle (EBSS, por sus siglas en inglés).

Se emprendió un experimento de hallazgo de intervalo de administración preliminar en la presencia (+UVA) y en ausencia (-UVA) de luz para seleccionar niveles apropiados de la dosis para los ensayos principales. El objeto de ensayo se ensayó a un nivel de dosis máximo de 1.000 µg/ml (el límite inferior indicado en el protocolo del estudio) y en un amplio intervalo de niveles de dosis inferiores: 500; 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6 y 7,81 µg/ml. Puesto que no era calculable el valor de IC<sub>50</sub> tanto en la presencia como en ausencia de irradiación UVA, tampoco se pudo calcular el valor del Factor de Fotoirritación (PIF). En este caso se consideró que la química no era fototóxica. Se usó el mismo intervalo de administración para el ensayo principal.

Se realizó un experimento principal usando los siguientes niveles de dosis: 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,3; 15,6 y 7,81 µg/ml. Las curvas de supervivencia en la presencia y en ausencia de luz UV mostraron un perfil similar, confirmando los resultados obtenidos en el experimento de hallazgo del intervalo de administración preliminar. El valor del Factor de Fotoirritación (PIF) no se pudo calcular puesto que no hubo valor de IC<sub>50</sub> para las dos curvas. El fotoefecto medio (MPE) fue 0,089 que cae dentro del intervalo no fototóxico. Puesto que este experimento produjo resultados claramente negativos, no se realizaron más experimentos.

El control positivo Clorpromazina indujo una respuesta positiva aceptable con un valor de PIF de 21,9 que indica el correcto funcionamiento del sistema de ensayo.

Puesto que un PIF no calculable o un MPE < 0,1 prevé "no fototoxicidad", sobre la base de los resultados obtenidos, se concluye que el objeto de ensayo se debería clasificar como "no fototóxico" en las condiciones experimentales indicadas.

Ejemplo 15: Estudio de fotoirritación/fotosensibilización de la crema al 0,1% del objeto de ensayo en conejillos de Indias.

El potencial de la crema al 0,1% del objeto de ensayo para ocasionar reacciones fotoalérgicas y/o fotoirritantes después de aplicación tópica a la piel, junto con exposición a luz ultravioleta, se valoró usando un modelo de conejillo de Indias.

El estudio se dividió en 2 fases. En la primera fase, se realizó una valoración de las propiedades fotoirritantes del objeto de ensayo en 6 grupos de animales. Se usaron tanto para establecer concentraciones adecuadas del objeto de ensayo para usar en el ensayo de sensibilización y proporcionar información sobre irritación fotoinducida. Los animales se trataron como sigue (Tabla 6):

Tabla 6

Número grupo	Tratamiento	Irradiación UV	Número de animales
1	Vehículo + Objeto de control	Sí	5
2	Vehículo + Objeto de control	No	5
3	Vehículo + Objeto de ensayo	Sí	5

(continuación)

Número grupo	Tratamiento	Irradiación UV	Número de animales
4	Vehículo + Objeto de ensayo	No	5
5	Vehículo + 8-metoxipsoraleno	No	5
6	Vehículo + 8-metoxipsoraleno	Sí	5

La segunda fase del estudio fue una valoración de sensibilización, en que se trató un total de 5 grupos como sigue (Tabla 7):

Tabla 7

Número de grupo	Tratamiento en inducción	Tratamiento en estimulación	Número de animales
7	F.C.A. <sup>1</sup> + Vehículo	Vehículo + Objeto de ensayo Vehículo + Objeto de control	10 5 del 10 5 del 10
8	F.C.A. + Objeto de control	Vehículo Objeto de control	10
9	F.C.A. + Objeto de ensayo	Vehículo Objeto de ensayo	10
10	F.C.A. + Vehículo	Vehículo Almizcle de Abelmosco	3
11	F.C.A.+ almizcle de abelmosco	Vehículo Almizcle de Abelmosco	5

5 <sup>1</sup> Adyuvante completo de Freund

#### Fotoirritación

El ensayo de fotoirritación se realizó usando 2 grupos (irradiados), cada uno de 5 animales, tratados con los objetos de control y de ensayo, placebo en crema y objeto de ensayo crema al 0,1%, respectivamente (cf. Tabla 6, grupos 1 y 3) y 2 grupos constituidos de manera similar (cf. Tabla 6, grupos 2 y 4), tratados de la misma manera pero no irradiados. Se esparcieron alícuotas del ensayo o objeto de control no diluido (100%), 2 concentraciones (20% y 50% en agua purificada) de los objetos de ensayo y de control y el vehículo solo (agua purificada), uniformemente por los sitios definidos de la piel preparados sobre el dorso de los animales. Los animales de los grupos irradiados (grupos 1 y 3) se expusieron a radiación tanto UVA (10 Julios/cm<sup>2</sup>) como UVB (0,1 Julios/cm<sup>2</sup>) después de la dosificación. Se investigó una sustancia de referencia de control positivo, 8-metoxipsoraleno, usando los mismos métodos a concentraciones de 0,001%, 0,01% y 0,1%, en animales, 5 de ensayo (irradiados) y 5 de control (no irradiados) (cf. Tabla 6, grupos 6 y 5, respectivamente). Aproximadamente 1, 4, 24, 48 y 72 horas después de estimulación a los objetos de control, de ensayo o de referencia, se examinaron evidencias en los sitios tratados de una reacción irritante al tratamiento.

#### Resultados

20 Se observó una ligera irritación en 1/5 de los animales en los sitios tratados con la crema al 0,1% del objeto de ensayo e irradiados con UV. Se observó una reacción ligera a bien definida en 4/5 de los animales tratados con el objeto de ensayo pero no irradiados con UV. También se observó una ligera reacción en 1/5 de los animales tratados con el objeto de control (placebo en crema) no irradiados con UV. No se observó reacción en los sitios tratados con el vehículo solo.



La reacción irritante observada en los animales tratados con el objeto de ensayo no fue fotoinducida como se observó en animales tanto irradiados con UV como, con mayor importancia, en no irradiados. También se observó una ligera reacción ocasional en animales no irradiados tratados con el objeto de control.

- 5 Los animales tratados con el objeto de referencia de control positivo, 8-metoxipsoraleno y después expuestos a luz ultravioleta, presentaron eritema muy definido a moderado y edema ligero en los sitios tratados con las 2 concentraciones mayores investigadas, 0,01% y 0,1%. No se observó respuesta en esos animales expuestos a 8-metoxipsoraleno sin posterior exposición a luz ultravioleta, que demuestra que la respuesta observada fue fotoinducida.

#### Fotosensibilización

- 10 Se realizó el ensayo de fotosensibilización usando 2 grupos de 10 animales (cf. Tabla 7, grupos 8 y 9) inducidos con el objeto de control y el objeto de ensayo y 1 grupo de control de 10 animales (cf. Tabla 7, grupo 7) inducidos con el vehículo seleccionado (agua purificada). En un intento para inducir sensibilización, se inyectó a los animales por vía intradérmica una emulsión de adyuvante completo de Freund. Los objetos de ensayo y de control, a concentración del 100%, se aplicaron por vía tópica por el área entre los sitios de inyección de FCA un total de 6 veces durante un periodo de 2 semanas. Se expusieron los animales a radiación tanto UVA (10 Julios/cm<sup>2</sup>) como UVB (0,1 Julios/cm<sup>2</sup>) después de la dosificación. Se trataron animales del grupo de control de la misma manera pero se usó el vehículo seleccionado (agua purificada) en vez de los objetos de ensayo o de control. Aproximadamente 2 semanas después de la estimulación de inducción final, se expusieron todos los animales por aplicación tópica de tanto el vehículo como el objeto de ensayo o de control a concentraciones del 20% y 50%, respectivamente. Estas concentraciones se seleccionaron ya que se consideraron no irritantes para la piel conjuntamente con irradiación ultravioleta sobre la base de los resultados obtenidos en el ensayo de fotoirritación. Los animales de los 2 grupos de ensayo y el grupo de control se expusieron a radiación tanto UVA (10 Julios/cm<sup>2</sup>) como UVB (0,1 Julios/cm<sup>2</sup>) después de la dosificación. Se trataron por vía tópica sitios adicionales en cada animal con tanto el vehículo como objetos de ensayo o de control, pero no se siguió tratamiento por exposición a irradiación ultravioleta. Aproximadamente 24, 48 y 72 horas después de exposición de estimulación se examinaron evidencias de reacción al tratamiento en los sitios tratados. Se investigó un objeto de referencia de control positivo, Almizcle de Abelmosco, usando los mismos métodos para probar la validez del sistema de ensayo. Un grupo de 5 animales (cf. Tabla 7, grupo 11) fue inducido con esta sustancia a una concentración de 15% en acetona. Se trató un grupo de control de 3 animales (cf. Tabla 7, grupo 10) de la misma manera con el vehículo solo (acetona). Se seleccionó una concentración de 10% del objeto de referencia (Almizcle de Abelmosco) en acetona para la estimulación.

#### Resultados

- La estimulación con el objeto de control, placebo de crema, a una concentración del 50% seguido por irradiación ultravioleta dio como resultado respuesta al objeto de control en 10/10 animales del grupo (grupo 8). Se observó respuesta al objeto de control en 6/10 animales del grupo 8 en los sitios tratados pero no irradiados. También se observó reacción en 5/5 animales del grupo de control (grupo 7) en sitios tratados con exposición con el objeto de control seguido por irradiación ultravioleta y en 4/5 animales de control en los sitios tratados con el objeto de control pero no irradiados. No se observó reacción para el vehículo solo.

- La estimulación con la crema al 0,1% del objeto de ensayo a concentración del 20% seguido por irradiación ultravioleta dio como resultado respuesta al objeto de ensayo en 8/10 animales del grupo (grupo 9). No se observó respuesta al objeto de ensayo en animales del grupo 9 en sitios tratados pero no irradiados. También se observó reacción en 5/5 animales del grupo de control (grupo 7) en sitios tratados con estimulación con el objeto de ensayo seguido por irradiación ultravioleta y en 1/5 animales de control en los sitios tratados con el objeto de ensayo pero no irradiados. No se observó reacción al vehículo solo.

- Sobre la base de los resultados anteriores, se observó una respuesta en animales tratados con el objeto de ensayo o de control. La reacción, que se observó en animales del grupo de control (no inducida con el objeto de ensayo), fue debida a un efecto irritante de la sustancia en vez de a sensibilización. Además, la reacción se observó también en sitios no irradiados con UV. Como resultado, se realizó una segunda estimulación (re-estimulación) con los objetos de ensayo y de control a una concentración inferior de 5%.

- No se observó respuesta en ningún animal de los grupos 8 y 9 con re-estimulación con los objetos de ensayo y de control a concentración del 5%, seguido por irradiación ultravioleta. No se observó respuesta de los objetos de ensayo o de control en animales de los grupos 8 ó 9 en los sitios tratados pero no irradiados. No se observó reacción en ningún sitio en animales del grupo de control (grupo 7) tratados con estimulación con los objetos de control o de ensayo. No se observó reacción al vehículo solo.

- La estimulación de animales de control positivo con el objeto de referencia (Almizcle de Abelmosco) a concentración del 10% seguido por irradiación ultravioleta produjo una respuesta (eritema muy ligero a ligero) en 4/5 animales del grupo (grupo 11). No se observó respuesta al objeto de referencia en animales del grupo 11 en los sitios tratados pero no irradiados. No se observó respuesta al objeto de referencia en animales del grupo 10, inducida con el vehículo. Esto indica que el sistema de ensayo puede detectar las propiedades fotoalérgicas de las sustancias.

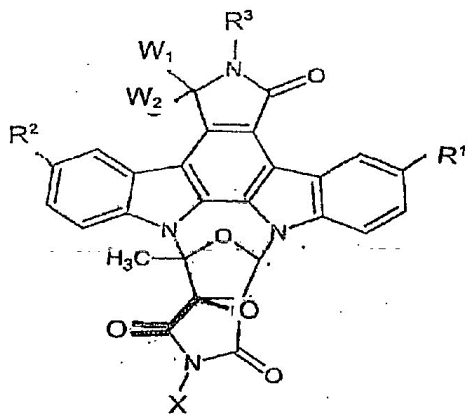
Conclusiones

Los resultados obtenidos no proporcionan indicación de que la crema al 0,1% del objeto de ensayo pueda ocasionar una respuesta fotoirritante o fotoalérgica después de exposición dérmica conjuntamente con luz ultravioleta.

5

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de un conjugado polimérico de un compuesto de indolocarbazol de la fórmula (I):



fórmula (I)

5 en la que:

$R^1$  y  $R^2$  son el mismo o un resto diferente y se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en:

- (a) hidrógeno, halógeno, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alquenilo inferior sustituido o no sustituido, alquinilo inferior sustituido o no sustituido, hidroxi, alcoxi inferior, carboxi, alcoxicarbonilo inferior, acilo, nitro, carbamoilo, alquilaminocarbonilo inferior,  $-NR^5R^6$ , en el que  $R^5$  y  $R^6$  se seleccionan cada uno independientemente de 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, aralquilo sustituido o no sustituido, alquilaminocarbonilo inferior sustituido o no sustituido, arilaminocarbonilo inferior sustituido o no sustituido, alcoxicarbonilo, carbamoilo, acilo o  $R^5$  y  $R^6$  se combinan con un átomo de nitrógeno para formar un grupo heterocíclico,
- 10 (b)  $-\text{CO}(\text{CH}_2)_j\text{R}^4$ , en el que  $j$  es 1 a 6 y  $R^4$  se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) hidrógeno, halógeno,  $-\text{N}_3$ ,
- (ii)  $-\text{NR}^5\text{R}^6$ , en el que  $R^5$  y  $R^6$  son como se definió anteriormente,
- (iii)  $-\text{SR}^7$ , en el que  $R^7$  se selecciona del grupo que consiste en: 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, aralquilo sustituido o no sustituido,  $-(\text{CH}_2)_a\text{CO}_2\text{R}^{10}$  (en el que  $a$  es 1 ó 2 y en el que  $R^{10}$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo inferior sustituido o no sustituido) y  $-(\text{CH}_2)_a\text{CO}_2\text{NR}^9\text{R}^6$ ,
- 20 (iv)  $-\text{OR}^8$ ,  $-\text{OCOR}^8$ , en los que  $R^8$  se selecciona de: 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,
- 25 (c)  $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_j\text{R}^4$ , en el que  $j$  y  $R^4$  son como se definió anteriormente;
- (d)  $-(\text{CH}_2)_d\text{CHR}^{11}\text{CO}_2\text{R}^{12}$  o  $-(\text{CH}_2)_d\text{CHR}^{11}\text{CONR}^5\text{R}^6$ , en los que  $d$  es 0 a 5,  $R^{11}$  es hidrógeno,  $-\text{CONR}^5\text{R}^6$  o  $-\text{CO}_2\text{R}^{13}$ , en el que  $R^{13}$  es hidrógeno o en el que alquilo inferior sustituido o no sustituido y  $R^{12}$  es hidrógeno o un alquilo inferior sustituido o no sustituido;
- 30 (e)  $-(\text{CH}_2)_k\text{R}^{14}$  en el que  $k$  es 2 a 6 y  $R^{14}$  es halógeno, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido,  $-\text{COOR}^{15}$ ,  $-\text{OR}^{15}$ , (en los que  $R^{15}$  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 o acilo sustituido o no sustituido),  $-\text{SR}^7$  (en el que  $R^7$  es como se definió anteriormente),  $-\text{CONR}^5\text{R}^6$ ,  $-\text{NR}^5\text{R}^6$  (en los que  $R^5$  y  $R^6$  son como se definió anteriormente) o  $-\text{N}_3$ ;
- 35 (f)  $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_m\text{R}^{16}$ , en el que  $m$  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,  $-\text{COOR}^{15}$ ,  $-\text{OR}^{15}$  (en los que  $R^{15}$  es como se definió anteriormente)  $-\text{CONR}^5\text{R}^6$  o  $-\text{NR}^5\text{R}^6$  (en los que  $R^5$  y  $R^6$  son como se definió anteriormente);

(g)  $-\text{CH}=\text{C}(\text{CO}_2\text{R}^{12})_2$ , en el que  $\text{R}^{12}$  es como se definió anteriormente;

(h)  $-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{16}$ , en el que  $n$  es 0 a 4 y  $\text{R}^{16}$  es como se definió anteriormente;

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

5 (j)  $-\text{CH}(\text{SR}^{23})_2$  y  $-\text{CH}_2-\text{SR}^7$  en el que  $\text{R}^{23}$  es alquilo inferior, alqueno inferior o alquino inferior y en el que  $\text{R}^7$  es como se definió anteriormente y

$\text{R}_3$  es hidrógeno, halógeno, acilo, carbamoilo, alquilo inferior sustituido o no sustituido, alqueno inferior sustituido o no sustituido, alquino inferior sustituido o no sustituido o amino,

10 según lo cual el término "alquilo inferior", cuando se usa solo o junto con otros grupos, se refiere a un grupo alquilo inferior de cadena lineal o ramificado que contiene de 1-6 átomos de carbono;

el término "alqueno inferior" se refiere a grupos alqueno  $\text{C}_2-\text{C}_6$  que pueden ser de cadena lineal o ramificados y pueden estar en la forma Z o E;

el término grupos "alquino inferior" se refiere a grupos alquino  $\text{C}_2-\text{C}_6$  que pueden ser de cadena lineal o ramificados y

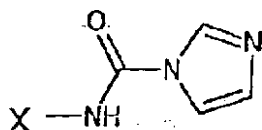
15 el término "alcoxi inferior" se refiere a un grupo alcoxi que contiene de 1 a 6 átomos de carbono y

$\text{W}^1$  y  $\text{W}^2$  son independientemente hidrógeno, hidroxilo o  $\text{W}^1$  y  $\text{W}^2$  representan juntos oxígeno

y en los que X es un resto polimérico,

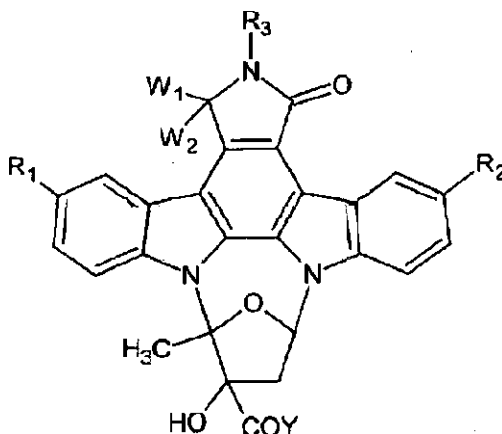
según lo cual el procedimiento comprende hacer reaccionar un compuesto polimérico de  $\omega$ -1H-imidazol-carboxamida de fórmula general (II)

20



fórmula (II)

en la que X se define como anteriormente con un compuesto de indolocarbazol de fórmula general (III)



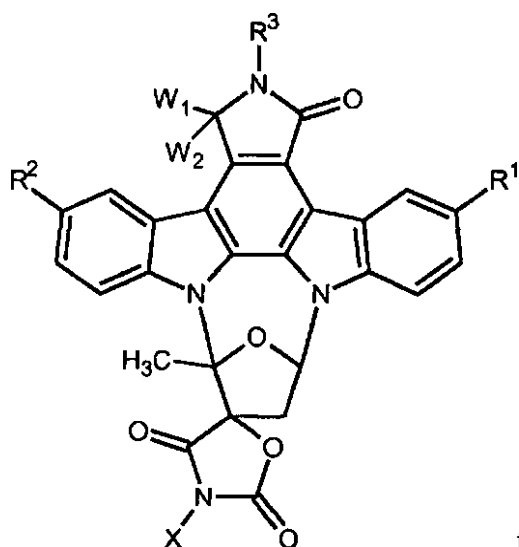
fórmula (III)

25 en la que  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{W}_1$  y  $\text{W}_2$  se definen como anteriormente y que están protegidos opcionalmente por grupos protectores y en la que Y representa un grupo saliente y en la que el procedimiento comprende además opcionalmente desproteger los grupos  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{W}_1$  y  $\text{W}_2$  para obtener el compuesto de la Fórmula (I).

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el procedimiento se realiza en la presencia de una base en un disolvente orgánico, en el que la base se puede seleccionar del grupo de hidruros de metal alcalino, en particular hidruro de sodio, y en el que la relación molar de la base al compuesto de la fórmula (III) puede ser entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 4:1, preferiblemente aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1,5:1 y más preferiblemente aproximadamente 1:1.

30

3. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el procedimiento se realiza en un disolvente orgánico, preferiblemente en un disolvente orgánico anhidro, seleccionado del grupo de diclorometano, cloroformo y N,N-dimetilformamida o en el que el procedimiento se realiza en atmósfera de gas inerte, preferiblemente en atmósfera de nitrógeno o argón.
- 5 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento se realiza a una temperatura de -10 a 60°C, preferiblemente de 0°C a 25°C y lo más preferiblemente a temperatura ambiente después de una etapa inicial a 0°C.
- 10 5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto conjugado polimérico de la fórmula (I) se obtiene directamente por purificación cromatográfica, en el que la purificación del compuesto conjugado polimérico de la fórmula (I) se realiza preferiblemente en un disolvente, seleccionado preferiblemente de diclorometano, agua, metanol, acetonitrilo, disolución tampón de formiato de amonio a diferentes relaciones de mezcla.
- 15 6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que da como resultado un rendimiento del compuesto de la fórmula (I) de aproximadamente 40% a aproximadamente 95% en peso, preferiblemente de aproximadamente 50% a aproximadamente 95% en peso basado en el peso del compuesto de la fórmula (III).
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el grupo saliente Y se selecciona de un triflato, un tosilato, un mesilato, un sulfato, un halógeno, un hidroxilo o un grupo alcoxi inferior y en el que el grupo saliente Y es preferiblemente un grupo alcoxi inferior, más preferiblemente un grupo metoxi.
- 20 8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polímero X se selecciona de poli(óxidos de alquileo), en particular de óxidos de (polietileno), en el que el polímero X tiene preferiblemente un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 100.000 Da, más preferiblemente de aproximadamente 200 a aproximadamente 50.000 Da y en el que el polímero X es preferiblemente un (polietileno)glicol (PEG), más preferiblemente seleccionado de polietilenglicoles alcoxi-sustituídos de manera terminal tales como metoxi-polietilenglicol (m-PEG).
- 25 9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que el polímero X es un (polietileno)glicol, por ej., un mPEG con un peso molecular promedio de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 Da, por ej., de aproximadamente 550 Da, aproximadamente 1.100 Da, aproximadamente 2.000 Da o aproximadamente 5.000 Da.
- 30 10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, W<sub>1</sub> y W<sub>2</sub> son hidrógeno.
11. Un conjugado polimérico de un compuesto de indolocarbazol de la fórmula (I):



fórmula (I)

en la que:

- 35 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub> y X son como se define en la reivindicación 1 o las reivindicaciones 8 a 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, W<sub>1</sub> y W<sub>2</sub> son preferiblemente hidrógeno y

en el que el polímero X es preferiblemente un (polietileno)glicol, por ej., un mPEG con un peso molecular promedio de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 Da, por ej., de aproximadamente 550 Da, aproximadamente

- 1.100 Da, aproximadamente 2.000 Da o aproximadamente 5.000 Da.
12. Conjugado polimérico según la reivindicación 11, para uso como medicamento, por ej., para aplicaciones tópicas o para aplicaciones sistémicas, por ej., por inyección, infusión intravenosa o inhalación.
- 5 13. Composición farmacéutica que comprende al menos un conjugado polimérico de la reivindicación 11, opcionalmente junto con portadores, adyuvantes, diluyentes o/y aditivos farmacéuticamente aceptables, en particular para aplicaciones de diagnóstico o/y terapéuticas.
- 10 14. El conjugado polimérico según una de las reivindicaciones 11 ó 12, para uso como medicamento para la prevención, alivio o/y tratamiento de patologías asociadas a HMGB1, en particular seleccionadas de: estenosis, reestenosis, aterosclerosis, artritis reumatoide, enfermedades autoinmunitarias, tumores, enfermedades infecciosas, septicemia, lesión pulmonar inflamatoria aguda, lupus eritematoso, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades del sistema nervioso central y periférico y esclerosis múltiple.
15. El conjugado polimérico para uso según la reivindicación 14, en el que el conjugado polimérico se inmoviliza de manera reversible en la superficie de un dispositivo médico.
16. El conjugado polimérico de la reivindicación 11, para uso:
- 15 (i) en la prevención, alivio y/o tratamiento de trastornos neurológicos, neuropatías y trastornos neurodegenerativos del sistema nervioso central y periférico,
- (ii) en la prevención, alivio o/y tratamiento de patologías dérmicas, caracterizadas en particular por hiperproliferación de queratinocitos,
- (iii) en la prevención, alivio o/y tratamiento de dolor relacionado con NGF e hiperalgesia,
- 20 (iv) en la prevención, alivio y/o tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, lesión de revascularización después de trasplante de órganos, afecciones cardiovasculares, enfermedades obstétricas y ginecológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades alérgicas y atópicas, patologías de tumores sólidos y líquidos, enfermedades de rechazo de trasplantes, enfermedades congénitas, enfermedades dermatológicas, enfermedades neurológicas, caquexia, enfermedades renales, afecciones de intoxicaciones iatrogénicas, enfermedades metabólicas e idiopáticas y enfermedades oftalmológicas o
- 25 (v) en la prevención, alivio y/o tratamiento de enfermedad de Behçet, síndrome de Sjögren, vasculitis, uveitis, retinopatías.
- 30 17. El conjugado polimérico para uso según la reivindicación 16, en el que las patologías dérmicas son: soriasis, dermatitis atópica, eccema crónico, acné, pitiriasis rubra pilaris, queloides, cicatrices hipertróficas y tumores cutáneos, y en el que la patología dérmica es en particular soriasis.
18. El conjugado polimérico para uso según la reivindicación 17, para administración tópica, en particular en forma de liposomas.
- 35 19. El conjugado polimérico para uso según la reivindicación 16, para administración sistémica o junto con al menos un fármaco anti-inflamatorio.

Figura 1

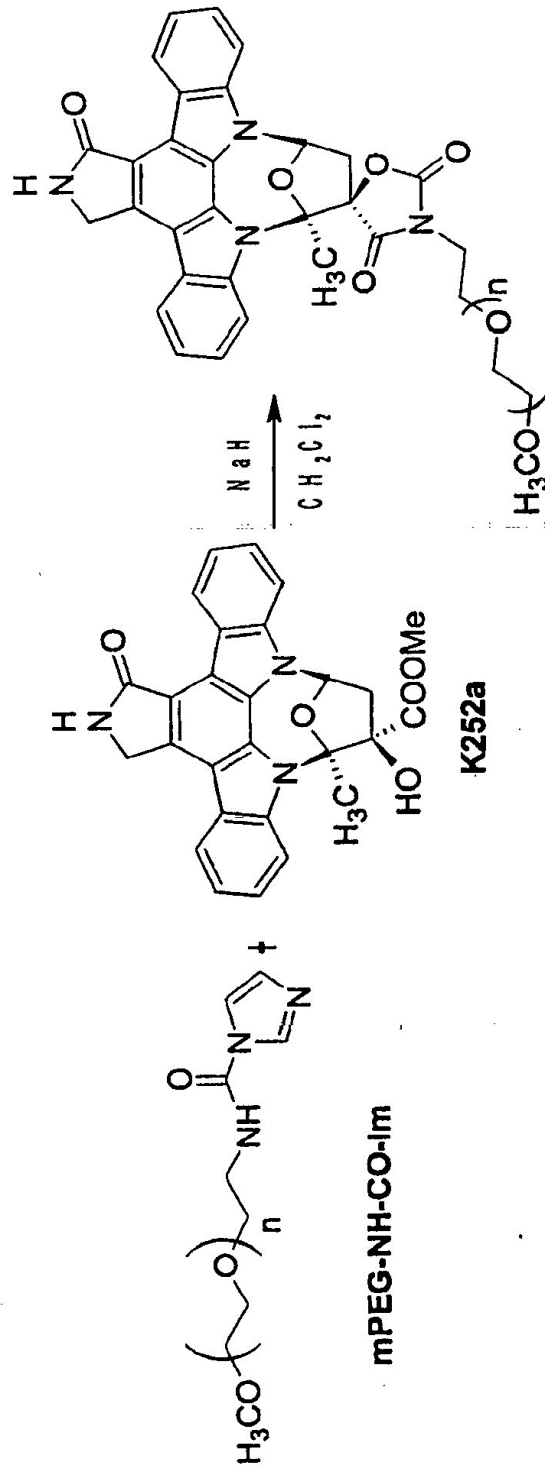
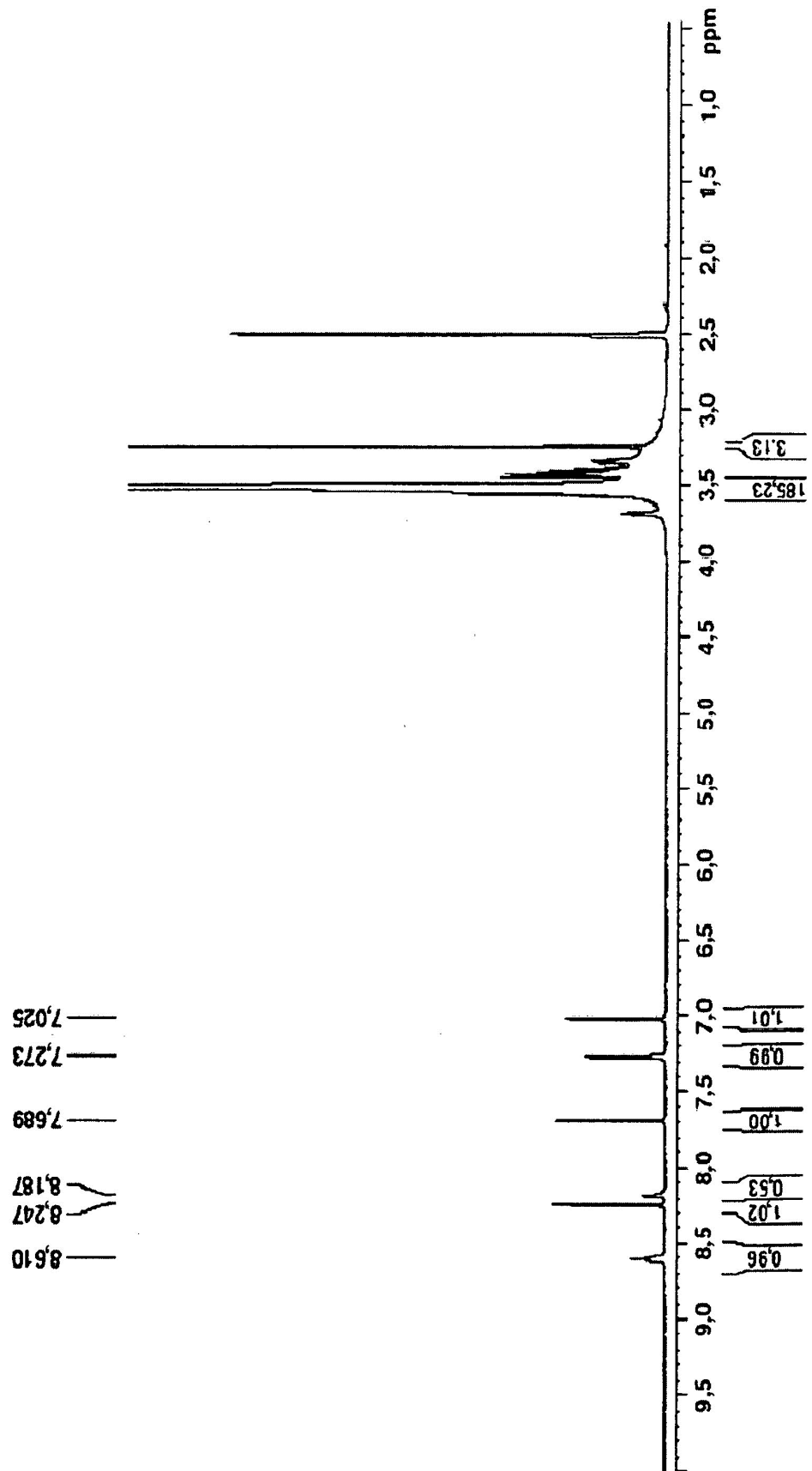


Figura 2

mPEG-NH-COIM 14/05/08





**Figura 2 (continuación)**

```

Parámetros Datos Actuales
NOMBRE      p08508_CT327_mPEG_NHCOIm_14_05__08
EXPNO       1
PROCNO      1

F2 - Parámetros Adquisición
Fecha:--    20080514
Hora        16,31
INSTRUM     spect
PROBHD      5 mm BBI 1H-BB
PULPROG     zg
TD          35918
DISOLVENTE  DMSO
NS          32
DS          2
SWH         7183,908 Hz
FIDRES      0,200009 Hz
AQ          2,4999428 s
RG          45,3
DW          69,600 usec
DE          6,00 usec
TE          300,0 K
D1          5,00000000 s
TD0         1
    
```

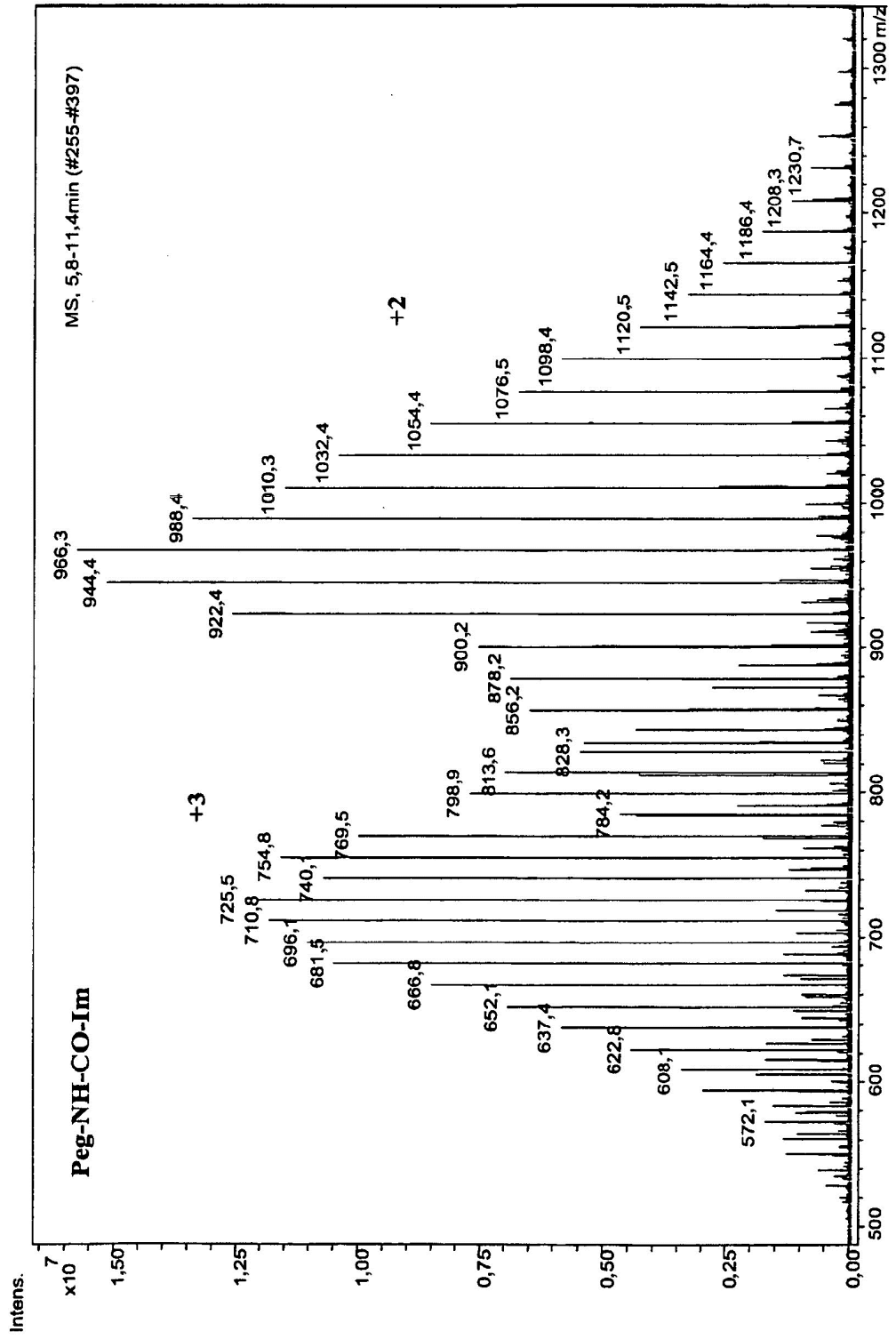
Figura 2 (continuación)

```

===== CANAL f1 =====
NUC1                1H
P1                  3,00 usec
PL1                 -1,00 dB
SFO1                400,1315764 MHZ

F2 - Parámetros procedimiento
SI                  32768
SF                  400,1300000 MHZ
WDW                 EM
SSB                 0
LB                  0,30 Hz
GB                  0
PC                  1,00
    
```

Figura 3



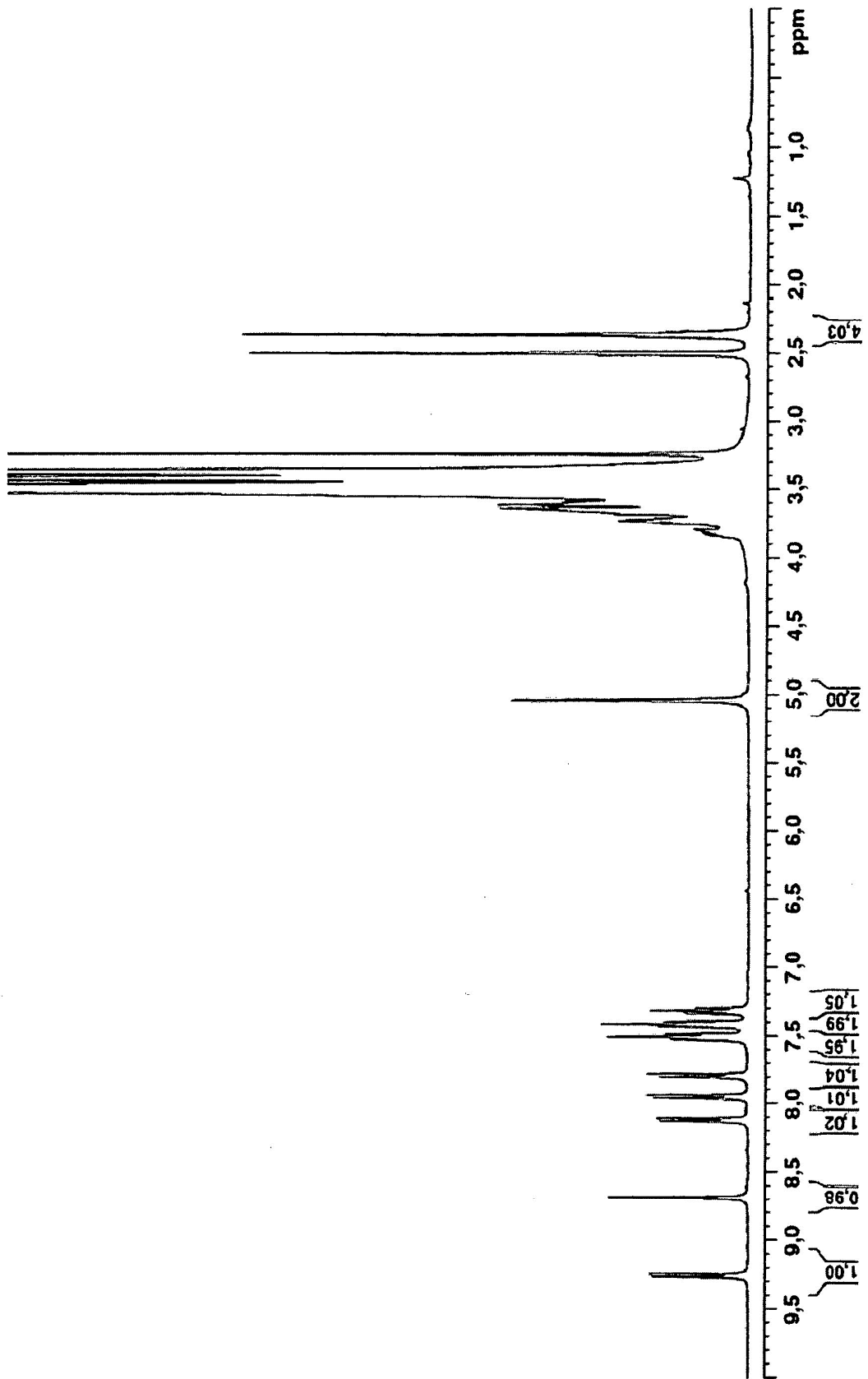


Figura 4

Figura 4 (continuación)

```

Parámetros Datos Actuales
NOMBRE  p06208_CT327_IA25B1
EXPNO   3
PROCNO  1

F2 - Parámetros Adquisición
Fecha-  20080407
Hora    9,09
INSTRUM spect
PROBHD  5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg
TD       35918
DISOLVENTE DMSO
NS       64
DS       2
SWH      7183,908 Hz
FIDRES   0,200009 Hz
AQ       2,4999428 s
RG       25,4
DW       69,600 usec
DE       6,00 usec
TE       300,0 K
D1       5,00000000 s
TD0      1
    
```

Figura 4 (continuación)

```

===== CANAL  f1 =====
NUC1                1H
P1                  3,00 usec
PL1                 -1,00 dB
SFO1                400,1315764 MHz

F2 - Parámetros procedimiento
SI                  32768
SF                  400,130000 MHz
WDW                 EM
SSB                 0
LB                  0,30 Hz
GB                  0
PC                  1,00
    
```

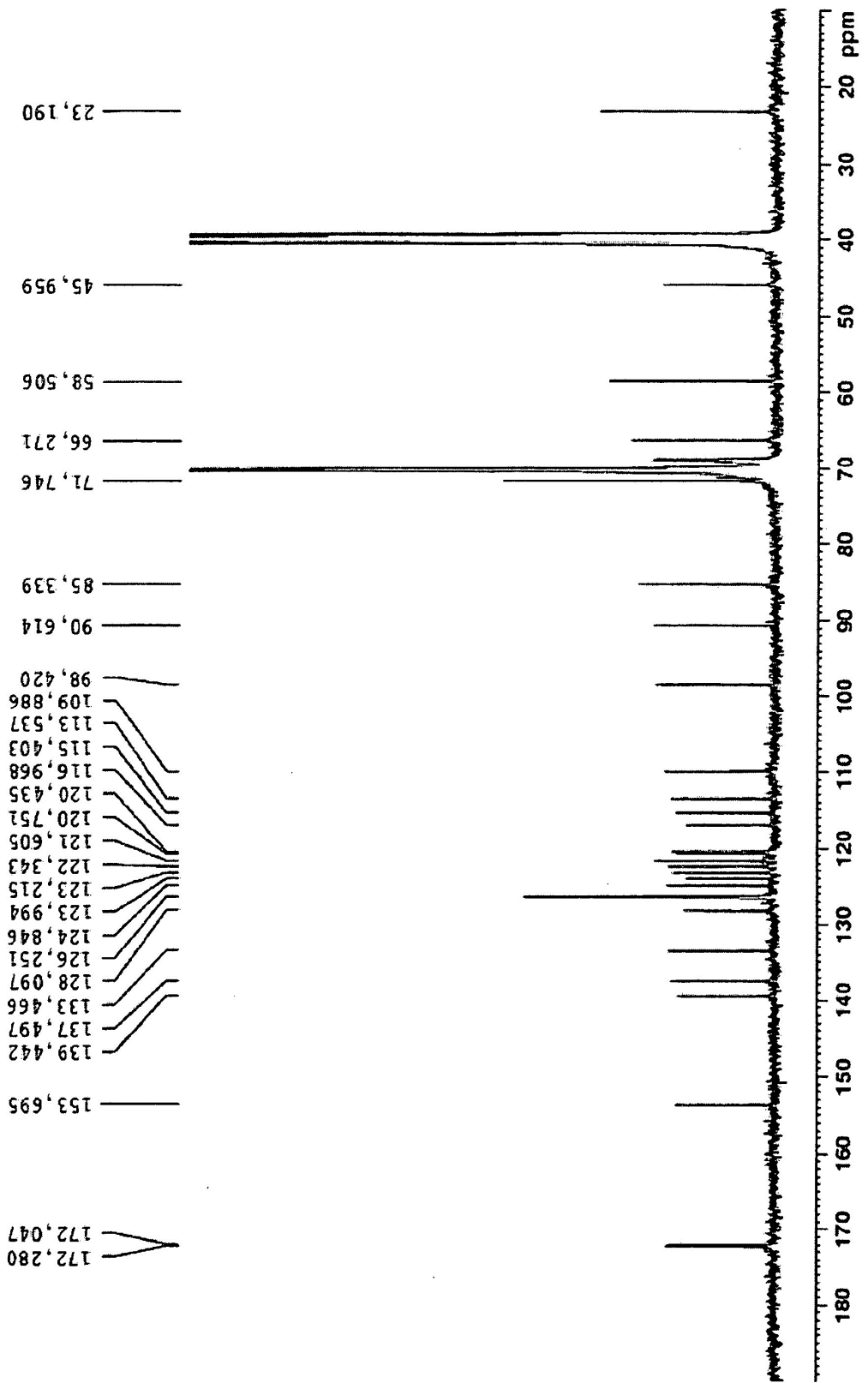


Figura 5

Figura 5 (continuación)

```

Parámetros Datos Actuales
NOMBRE  p06208_CT327_IA25B1
EXPNO   2
PROCNO  1

F2 - Parámetros Adquisición
Fecha-- 20080405
Hora    12,47
INSTRUM spect
PROBHD  5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zgpg
TD      50922
DISOLVENTE DMSO
NS      16384
DS      4
SWH     24154,590 Hz
FIDRES  0,474345 Hz
AQ      1,0541354 s
RG      16384
DW      20,700 usec
DE      30,00 usec
TE      300,0 K
D1      3,00000000 s
d11     0,03000000 s
DELTA   2,90000010 s
TD0     1
    
```



Figura 5 (continuación)

```

===== CANAL f1 =====
NUC1          13C
P1           10,00 usec
PL1          -6,00 dB
SFO1        100,6238364 MHz

===== CANAL f2 =====
CPDPRG2      waltz16
NUC2          1H
PCPD2        80,00 usec
PL2          -1,00 dB
PL12         16,20 dB
PL13         19,00 dB
SFO2        400,1322007 MHz

F2 - Parámetros procedimiento
SI           131072
SF           100,6127690 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           3,30 Hz
GB           0
PC           1,40
    
```

Figura 6

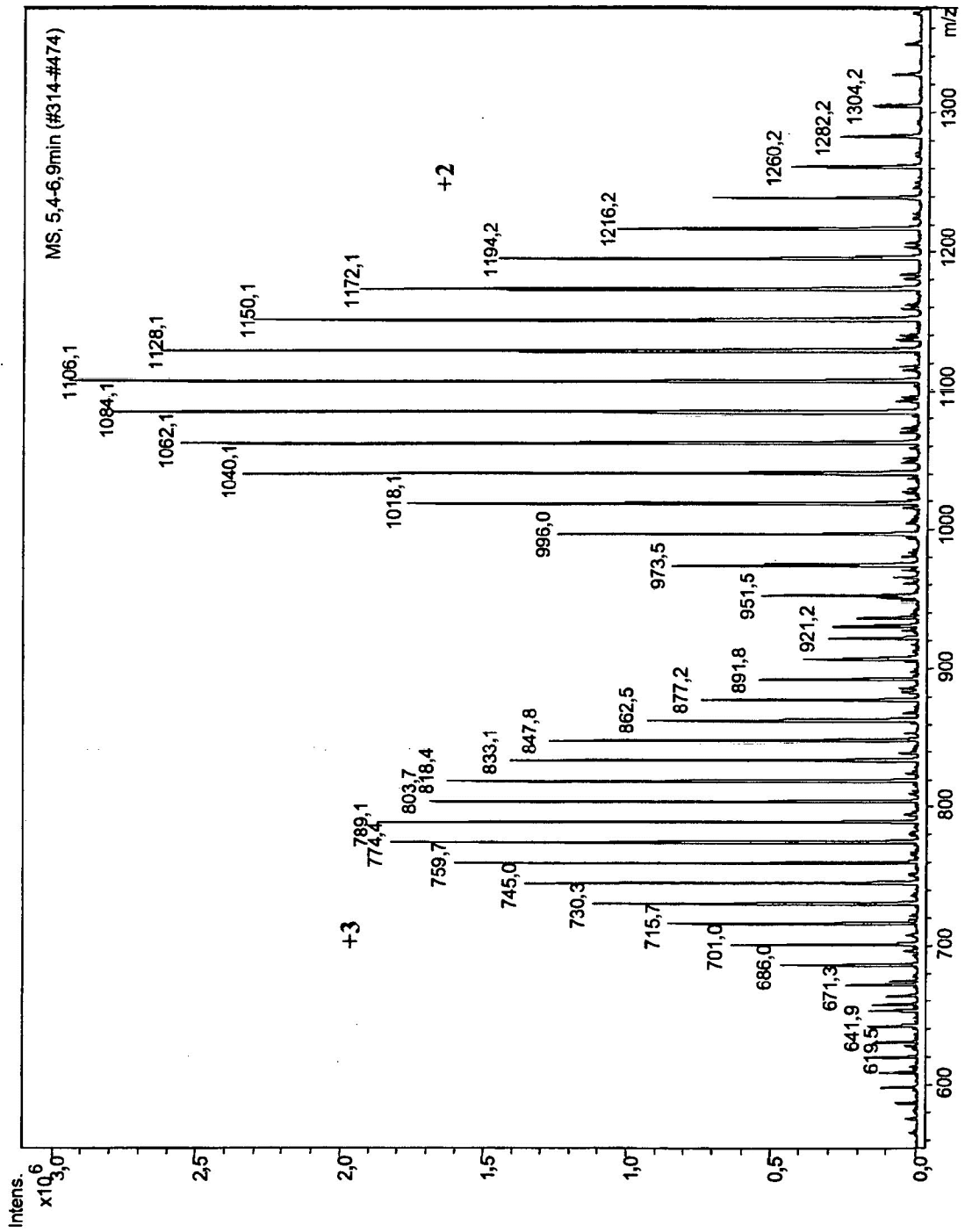


Figura 7

