

"AGONISTAS DEL RECEPTOR TIPO TOLL 7 COMO INMUNOESTIMULADORES PARA PROVOCAR LA INMUNIDAD ANTITUMORAL INNATA"

1 CAMPO DE LA INVENCION

[001] La presente invención se refiere a compuestos que pueden activar específicamente TLR7. Los compuestos de la invención son útiles porque pueden estimular la inmunidad innata. Los compuestos de la invención se pueden utilizar en el tratamiento de afecciones como el cáncer, las infecciones virales y las lesiones cutáneas. Los compuestos pueden formularse opcionalmente para mejorar la penetración después de la administración tópica, dicha composición preferiblemente inicia una respuesta de citocinas inflamatorias específicas locales al tiempo que limita el eritema indeseable y otras reacciones inflamatorias. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la invención y preferiblemente un compuesto adicional como imiquimod y/o resiquimod (R848). La invención también se refiere a una composición que comprende un compuesto de la invención y a un compuesto para su uso como medicamento. Otros aspectos, realizaciones, ventajas y aplicaciones de la invención se aclararán a partir de la descripción adicional en este documento.

2 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[002] La proteína de muerte celular programada 1, también conocida como PD-1 y CD279 (grupo de diferenciación 279), es una proteína en la superficie de las células T y B que desempeña un papel en la regulación de la respuesta del sistema inmunitario a las células del cuerpo humano mediante la regulación negativa del sistema inmunitario y la promoción de la autotolerancia al suprimir la actividad inflamatoria de las células T. Esto previene las enfermedades autoinmunes, pero también puede evitar que el sistema inmunitario destruya las células cancerosas. El papel del sistema inmunitario humano en el campo antitumoral se subestimó durante

muchos años hasta la aplicación clínica exitosa de los inhibidores de puntos de control inmunitarios, por ejemplo, los inhibidores de PD-1/PD-L1. Los inhibidores de PD-1 y los inhibidores de PD-L1 son un grupo de fármacos inhibidores de puntos de control que bloquean la actividad de las proteínas de puntos de control inmunitarios PD-1 y PDL1 presentes en la superficie de las células.

[003] El sistema inmunitario tiene múltiples mecanismos de "freno" para regular negativamente la activación y la función de las células T u otras células inmunitarias para proteger las propias células sanas del huésped. Los inhibidores de puntos de control como PD-1/PD-L1, así como los antagonistas de CTLA-4, pueden liberar selectivamente los "frenos" del sistema inmunitario para aprovechar la llamada "inmunidad adaptativa" y producir respuestas antitumorales duraderas. Sin embargo, solo una pequeña población de pacientes con cáncer suele beneficiarse clínicamente al usar inhibidores de puntos de control.

[004] El sistema inmunológico humano también está diseñado para proteger al cuerpo de entidades extrañas como virus y bacterias mediante una coordinación sistémica entre una gran variedad de tipos de células con funciones inmunológicas altamente selectivas, la llamada "inmunidad innata". Los tipos de células incluyen células fagocíticas como las células dendríticas (CD), los macrófagos, las células T gamma delta y las células asesinas naturales (NK) que actúan como barreras contra entidades extrañas. El mecanismo detrás de esto es utilizar patrones moleculares conservados de patógenos y el receptor Fc expresado para reconocer e iniciar una respuesta inmune rápida. Dado que las células B y T del sistema inmunitario adaptativo son capaces de montar una respuesta de memoria, una comunicación entre los sistemas inmunitarios innato y adaptativo mediada por las células dendríticas (CD) puede iniciar una respuesta inmunológica específica y duradera.

[005] Las CD son responsables de muestrear constantemente su entorno a

través de la fagocitosis, la endocitosis mediada por receptores y la micropinocitosis. Con la ayuda de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), los DC son capaces de reconocer una gran cantidad de entidades extrañas. Una vez que los PRR se activan, las DC se activan y maduran en células presentadoras de antígenos (APC) más fuertes y aumentan la expresión en la superficie celular de moléculas coestimuladoras como CD40 y CD86 para lograr un cebado y activación óptimos de las células T.

[006] Los receptores tipo herramienta (TLR) son bien conocidos como miembros de la familia PRR. Los receptores tipo Toll (TLR), que actualmente comprenden una familia de genes de 10 receptores con diferentes especificidades, forman parte del sistema de reconocimiento de patrones de patógenos celulares, que ha evolucionado para defenderse contra una variedad de infecciones (bacterias, virus, hongos). La activación de los TLR conduce a respuestas de citocinas, por ejemplo, con la liberación de interferones y la activación de células inmunitarias específicas. La expresión funcional de los TLRs seleccionados en los tejidos es muy diferente. Parte de los receptores se encuentran en la superficie celular, como TLR4 (estimulado por el lipopolisacárido LPS de *E. coli*), por ejemplo, en las células epiteliales, o TLR3, 7, 8 y 9 ubicados en las membranas endosomales de células inmunitarias específicas. Estos últimos son todos activados por ácidos nucleicos, pero reconocen varios tipos de ellos. Por ejemplo, TLR9 es activado por ADN monocatenario que contiene subsecuencias CpG, TLR7 y 8 son activados por ARN monocatenario, y TLR3 es activado por ARN bicatenario.

[007] Los TLRs también se han implicado en diversas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, siendo el ejemplo más claro el papel que desempeña el TLR7 en la patogénesis del lupus eritematoso sistémico (Barrat y Coffman, *Immunol Rev*, 223:271-283, 2008). Además, un polimorfismo TLR8 se ha asociado con la artritis reumatoide (Enevold et al., *J Rheumatol*, 37:905-10, 2010).

[008] Cada TLR tiene una clase específica de moléculas para reconocer diferentes componentes superficiales e intracelulares de los microorganismos, que van desde los lípidos de membrana de las bacterias hasta los ARN monocatenarios o bicatenarios de un virus. Los TLR que se expresan intracelularmente se encuentran en el compartimento endosomal e incluyen TLRs como TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 y TLR13. Se informa que TLR7 y TLR8 son receptores TLR diméricos que comprenden un motivo de repetición rico en leucina (LRR) como ectodominio, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático, que tiene un dominio de señalización del receptor Toll/interleucina-1 (IL-1) (TIR). Se ha reportado que TLR7 se expresa en células B y células dendríticas plasmocitoides (pDCs), mientras que TLR8 puede expresarse en monocitos y células dendríticas mieloides (mDCs).

[009] Tras una unión agonística en TLR7/8 con un producto de degradación como la guanosina derivada de ARN monocatenarios (ssRNA), la interfaz de dimerización se reorganiza incluyendo tanto las interfaces proteína-proteína como las mediadas por ligandos. Un cambio conformacional en los ectodominios TLR7/8 conduce a una configuración activada de los dominios de señalización TIR citoplasmáticos. Posteriormente, hay una señal dependiente de MyD88 seguida de una fuerte respuesta de interferón y producción de citocinas proinflamatorias en las CD. Además, las CD activadas también regulan al alza la expresión en la superficie celular de moléculas coestimuladoras como CD40 y CD86. La expresión y el compromiso coestimuladores conducen a un cebado y activación óptimos de las células T.

[010] Más recientemente, se descubrió que la presentación del antígeno asociado al tumor (TAA) tiene un impacto en el cebado y la activación de las células T para generar una respuesta inmunitaria antitumoral robusta y a largo plazo. Los estudios demostraron que la absorción y presentación de antígenos por parte de las APC es más eficiente cuando el antígeno se une a un complejo anticuerpo-antígeno,

el llamado "complejo inmune". Dado que las CD activadas también regulan al alza la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), el antígeno internalizado durante un encuentro con un microorganismo se digiere y sus péptidos son exhibidos por el MHC en la membrana celular de las CD. Las células T activadas pueden reconocer y destruir las células tumorales que contienen neoantígenos unidos al MHC.

[011] Como se mencionó anteriormente, solo una pequeña población de pacientes experimenta beneficios clínicos con los inhibidores de puntos de control. Para los pacientes con cáncer, una de las razones es que la presencia y la frecuencia de las células inmunitarias pueden diferir de un tumor a otro. Una frecuencia baja de células T en el microambiente inmune del tumor (TIME) se considera "fría", mientras que una frecuencia alta de células T como "caliente". Los estudios clínicos revelaron que los pacientes con tumores calientes tuvieron desenlaces más sólidos y una supervivencia sin enfermedad más prolongada que aquellos con frío.

[012] Aunque un estimulador agonístico a través de la vía TLR7/8 puede activar las CD seguidas de cebado y activación de células T, pequeñas moléculas sintéticas como el imiquimod y el resiquimod (R848) solo se han aprobado como tratamiento tópico, por ejemplo, el imiquimod para el tratamiento del carcinoma basocelular intratumoral para evitar la inflamación sistémica. Este tratamiento clínico limita en gran medida la terapia con agonistas TLR7/8 para los tumores sólidos.

[013] Cuando las lesiones cancerosas progresan, pueden volverse metastásicas y se puede usar quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia además de la cirugía. El resiquimod, un miembro de la familia de la imidazoquinolina relacionado en estructura con el imiquimod, es un modificador de la respuesta inmunitaria que actúa como agonista de los receptores tipo Toll 7 y 8. Sin embargo, es distintivamente diferente de Imiquimod, ya que Imiquimod envía señales a través del receptor tipo Toll 7 (TLR7) solamente. El imiquimod está aprobado por la FDA para el tratamiento de una serie de enfermedades de la piel. En comparación con el imiquimod, el resiquimod

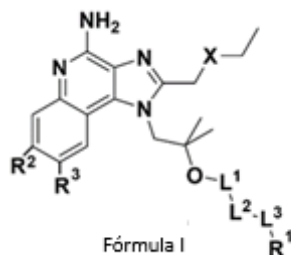
es un inductor más potente del TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12. Se ha demostrado que el resiquimod promueve la presentación cruzada de antígenos exógenos, lo que resulta en la inducción eficiente de respuestas de células T CD8+ específicas de antígeno en un modelo animal. Los resultados de los estudios en animales han confirmado la capacidad del resiquimod para activar las células dendríticas, incluida la capacidad de inducir la activación local de las células inmunitarias, estimular la producción de citocinas proinflamatorias y mejorar la presentación de antígenos por parte de las células dendríticas, lo que conduce a la activación de respuestas celulares efectivas. La administración sistémica de resiquimod, con radiación, prepara respuestas inmunitarias antitumorales duraderas en un modelo de linfoma (Dovedi SJ 2013, Blood 121(2):251-9.). El resiquimod se ha utilizado en ensayos clínicos para tratar la queratosis actínica, el linfoma cutáneo de células T y el virus del herpes simple con resultados mixtos. Otros usos del estado de la técnica del resiquimod incluyen la administración como agente adyuvante de la vacuna para tratar diversas enfermedades, incluido el melanoma metastásico, con resultados inconsistentes. El resiquimod se ha utilizado como adyuvante de la vacuna contra la proteína NYESO-1 en el tratamiento del melanoma (Sabado RL Cancer Immunol Res. 2015).

[014] Sigue siendo necesario disponer de agonistas alternativos a TLR7 que, además, sean preferiblemente específicos y eficaces.

3 RESUMEN DE LA INVENCION

[015] La presente invención tiene como objetivo proporcionar compuestos que son agonistas efectivos de TLR7 para dirigirse a la inmunidad innata. Los inventores encontraron nuevos agonistas TLR7 basados en imidazoquinolina que son, por ejemplo, eficaces para iniciar una respuesta inmunológica específica y duradera contra, por ejemplo, el cáncer.

[016] Por lo tanto, en un primer aspecto la invención proporciona un compuesto de acuerdo con **fórmula I**



[017] o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,

[018] donde X es un átomo de oxígeno, C1-C5-alquilo (preferiblemente CH₂) o NH;

[019] donde R² y R³ se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, C1-C5-alquilo, C4-C7-cicloalquilo, C4-C7-heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo; preferiblemente tanto R² como R³ son hidrógeno;

[020] y en los que L¹, L², L³ y R¹ se definen a continuación en las letras a) o b) o c):

[021] (a) L¹ es alquilo C2-C6;

[022] L² es un heterociclo de 5 o 6 miembros o OH; L³ está ausente o seleccionado del grupo formado por hidrógeno, alquilo C1-C2 y CH₂C(CH₃)₂; y

[023] R¹ está ausente o se selecciona del grupo formado por hidrógeno, NH₂, OH y SCH₃;

[024] (b) L¹ es alquilo C2-C6;

[025] L² se selecciona del grupo formado por C(O), NHC(O)CH₂ y NHC(O)C(CH₃)₂;

[026] L³ se selecciona del grupo formado por un heterociclo de 6 miembros, OH, C(O)O, S, SO₂ y SO₃H; y

[027] R¹ está ausente o metilo o hidrógeno;

[028] (c) L¹ es C(O)CH₂;

[029] L² es un heterociclo de 6 miembros o NH₂;

[030] L³ no está presente; y

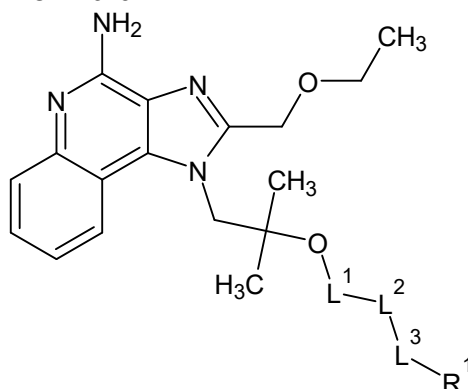
[031] R¹ es metilo o hidrógeno o está ausente;

[032] y en el que si L^3 no está presente, entonces L^2 está directamente unido a través de un enlace covalente a R^1 .

[033] En una realización preferida del primer aspecto, R^2 y R^3 son hidrógeno.

[034] Preferiblemente, X en el compuesto de la invención es un átomo de oxígeno.

[035] En una realización adicional, el compuesto de la invención tiene una estructura de acuerdo con **fórmula II**



Fórmula II

[036] donde L^1 , L^2 , L^3 y R^1 son los que se definen a continuación en las letras d), e) o f)

[037] (d) L^1 es alquilo C2-C6;

[038] L^2 es un heterociclo de 5 o 6 miembros (preferiblemente triazol o piperazina), o OH; L^3 está ausente o seleccionado del grupo formado por hidrógeno, alquilo C1-C2 y $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$; y

[039] R^1 está ausente o se selecciona del grupo formado por hidrógeno, NH_2 , OH y SCH_3 ;

[040] e) L^1 es alquilo C2-C3;

[041] L^2 se selecciona del grupo formado por $\text{C}(\text{O})$, $\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2$ y $\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_2$;

[042] L^3 se selecciona del grupo formado por un heterociclo de 6 miembros

(preferiblemente piperazina), OH, C(O)O, S, SO₂ y SO₃H; y

[043] R¹ está ausente o metilo o hidrógeno;

[044] (f) L¹ es C(O)CH₂;

[045] L² es un heterociclo de 6 miembros (preferiblemente piperazina) o NH₂;

[046] L³ no está presente; y

[047] R¹ es metilo o hidrógeno o está ausente;

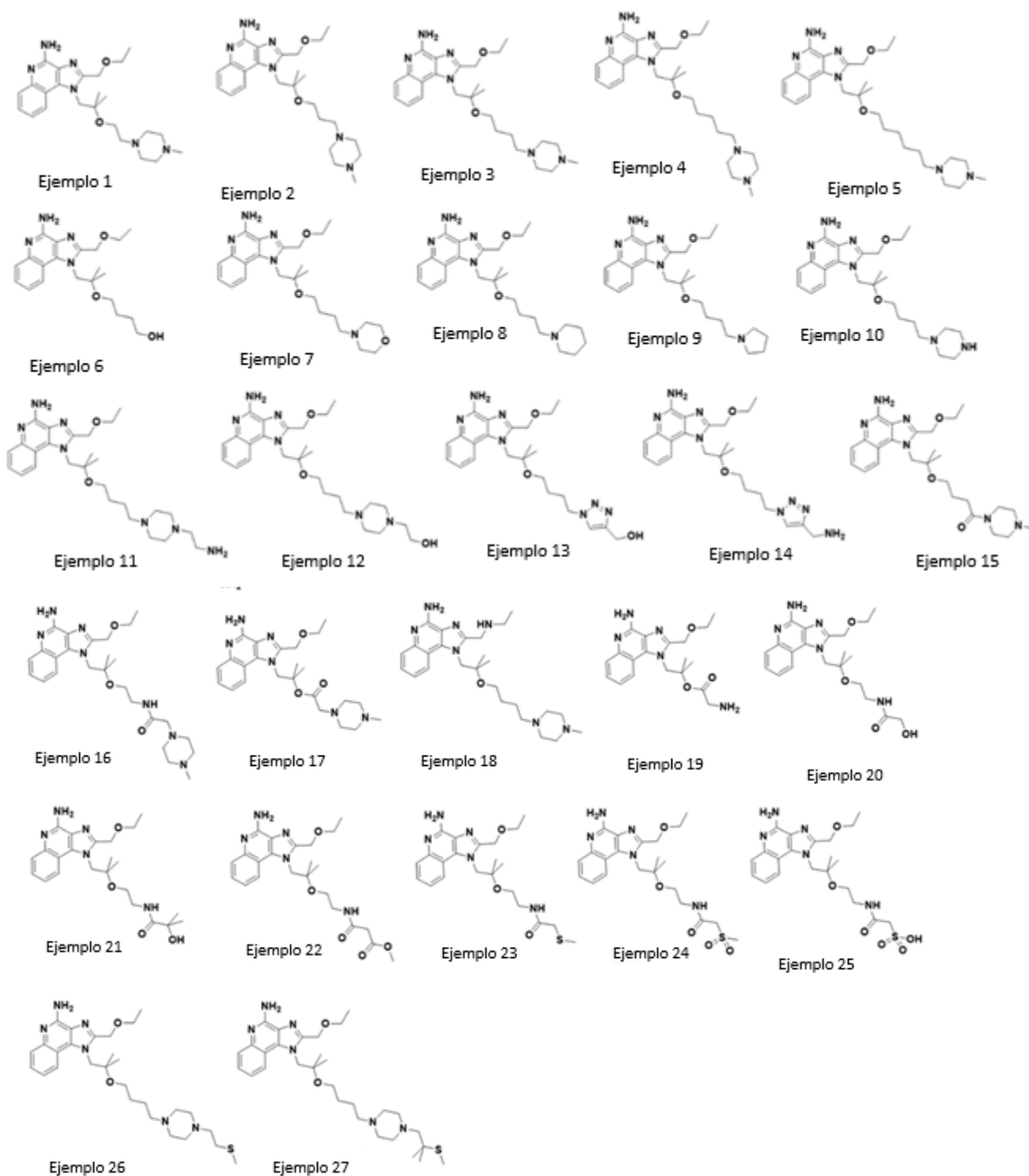
[048] En una realización preferida de un compuesto con la Fórmula II de la invención

[049] L¹ es alquilo C₂-C₆;

[050] L² es un heterociclo de 5 o 6 miembros o OH; L³ está ausente o seleccionado del grupo formado por hidrógeno, alquilo C₁-C₂ y CH₂C(CH₃)₂; y

[051] R¹ está ausente o se selecciona del grupo formado por NH₂, OH y SCH₃;

[052] En una realización preferida de particularidad del compuesto de la invención, el compuesto tiene una estructura seleccionada del grupo que consta de las estructuras enumeradas a continuación que se designan como Ejemplo 1 a Ejemplo 27:



[053] Otro compuesto preferido de la invención se refiere a un compuesto en el que

[054] X es NH;

[055] L¹ es alquilo C2-C6;

[056] L² es un heterociclo de 5 o 6 miembros;

[057] L³ no está presente; y

[058] R¹ es metilo o hidrógeno; y

[059] R² y R³ son hidrógeno.

[060] También se prefiere un compuesto de la invención en el que el compuesto

[061] (i) activa TLR7 con más fuerza que TLR8; y/o

[062] (ii) induce la producción de IL-6, IL1-b y TNF- α ; y/o

[063] (iii) induce la regulación positiva de CD40 y/o CD86 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

[064] También se prefiere un compuesto según la invención, en el que el compuesto induce la secreción de TNF α de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) si el compuesto entra en contacto con dichas células.

[065] También se prefiere un compuesto de acuerdo con la invención, en el que el compuesto tiene para TLR7 una EC50 de menos de 10 μ M y preferiblemente menos de 0,01 μ M, cuando se prueba en un sistema de prueba descrito en el Ejemplo 6.2.1.

[066] Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención.

[067] La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención y, preferiblemente, un compuesto adicional como imiquimod y/o resiquimod (R848).

[068] Un aspecto adicional de la invención se refiere a un compuesto de la invención para su uso como medicamento.

[069] Un aspecto adicional de la invención se refiere a un compuesto de la invención para el uso en el tratamiento de una enfermedad en el que dicho compuesto se utiliza en dicho tratamiento en combinación con los compuestos adicionales imiquimod y/o resiquimod (R848).

[070] Las realizaciones preferidas proporcionan un compuesto de la

invención para el uso en el tratamiento de una condición seleccionada del grupo que consiste en cáncer, una infección viral, lesiones cutáneas no cancerosas, lesiones cutáneas precancerosas, lesiones cutáneas cancerosas, cáncer de vejiga, enfermedad cutánea mediada por virus, siendo dicha composición opcionalmente formulada para una penetración mejorada después de la administración tópica, dicha composición preferiblemente iniciando una respuesta de citocina inflamatoria específica local mientras limita eritema indeseable y otras reacciones inflamatorias.

[071] En las realizaciones preferidas de la composición de la invención, el compuesto de la invención está comprendido en una cantidad de entre el 0,01% y el 1%.

[072] Un aspecto adicional se refiere a una composición de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer de vejiga, en la que la composición está formulada para la administración intraquística.

[073] En realizaciones preferidas de la composición de la invención, la invención comprende además componentes adicionales de uno de los grupos i a xiii descritos a continuación:

[074] i. Ácido oleico (50 %) y miristato de isopropilo (50 %) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total del 1 % en peso/vol, o

[075] ii. Miristato de isopropilo (50%) y lauril sulfato de sodio (50%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 0,5% en peso/vol, o iii. Ácido oleico (50%) y lauril sulfato de sodio (50%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 0,5% en peso/vol, o iv. Ácido oleico (33 %), miristato de isopropilo (33 %) y lauril sulfato de sodio (33 %) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total del 0,5 % en peso/vol, o

[076] v. Palmitato de isopropilo (50%) y oleato de sodio (50%) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total del 2% en peso/vol, o

[077] vi. Lauril sulfato de sodio (25%) y ácido linoleico (75%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 1,0% en peso/vol, o vii. Ácido palmítico (50 %) y laurato de isopropilo (50 %) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total del 2,0 % en peso/vol, o

[078] viii. Ácido oleico (50 %) y ácido linoleico (50 %) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 1,5 % en peso/vol, o

[079] ix. Ácido linoleico (25 %), ácido oleico (25 %) y linoleato de isopropilo (50 %) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 0,5 % en peso/vol, o

[080] x. Oleato de sodio (33 %), ácido oleico (33 %) y palmitato de metilo (33 %) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 2,0 % en peso/vol, o

[081] xi. Una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol, o

[082] xii. Ácido oleico (10 %) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol, o

[083] xiii. Ácido oleico (2%) y lauril sulfato de sodio (5%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol.

[084] Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para el tratamiento de un cáncer, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la invención al sujeto que padece cáncer.

[085] Sin embargo, un aspecto adicional de la invención proporciona un método para el tratamiento de la lesión tumoral de la piel y la enfermedad de la piel inducida por virus, que comprende la administración tópica de la composición de la invención, siendo dicha composición preferiblemente eficaz para reducir o eliminar dicha lesión o enfermedad al tiempo que limita las reacciones adversas de la piel seleccionadas del eritema y la inflamación, dicha composición reduce preferiblemente la penetración de la lesión tumoral en el tejido circundante y la metástasis en los ganglios linfáticos.

[086] Sin embargo, un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para el tratamiento del tumor de vejiga, que comprende la administración intraquística de la composición de la invención, dicha composición mejora preferiblemente la permeabilidad y la entrega del compuesto de la invención al epitelio vesical al tiempo que limita la irritación, dicha composición reduce preferiblemente la invasión tumoral al tejido muscular circundante y la metástasis a los ganglios linfáticos.

[087] En realizaciones preferidas del método de la invención, dicho tratamiento comprende además la administración sistémica a dicho sujeto de al menos un modulador inmune seleccionado entre anti-PD1, anti-PD-L1, anticuerpo anti-CTLA-4, anticuerpo anti-CD137, anticuerpo CD40 agonístico, agonista CD134 (Anti-OX40) y PLX3397.

[088] En realizaciones preferidas del método de la invención, dicho tratamiento comprende además la administración sistémica a dicho sujeto de interferón gamma.

[089] En realizaciones preferidas del método de la invención, dicho tratamiento comprende además la administración de radiación local con o sin anticuerpo anti-PD1 sistémico.

[090] En realizaciones preferidas del método de la invención, dicho tratamiento comprende además la administración de terapia fotodinámica.

[091] En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de activación de TLR 7 y/o 8 en una muestra biológica, que comprende el contacto de dicha muestra biológica con un compuesto de acuerdo con la invención.

[092] En un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto de la invención para su uso como adyuvante de vacuna o para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con un agente de inmunoterapia anticancerígeno (preferiblemente ipilimumab, nivolumab o pembrolizumab).

[093] Otros aspectos, ventajas, aplicaciones y usos de los polipéptidos y composiciones se aclararán a partir de la divulgación adicional en este documento. A lo largo del texto de esta especificación se citan varios documentos. Nada de lo aquí contenido debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a antedatar dicha divulgación en virtud de una invención anterior.

4 LEYENDAS DE FIGURAS

[094] **Figura 1:** Figura 1. La unión molecular entre R848 y el mono TLR7 (PDB 5GMH), en la que el grupo de hidrógeno no enterrado de R848 se resaltó con la flecha negra. Arriba a la derecha: La estructura química del R848.

[095] **Figura 2:** La estructura química de los agonistas TLR7/8 recientemente reportados.

[096] **Figura 3:** Una biblioteca de agonistas TLR7 selectivos y de alta potencia.

[097] **Figura 4:** Pruebas de agonistas de TLR7 in vitro. Se generó un diagrama de dispersión X-Y para cada agonista/estimulante mediante el trazado de la concentración del agonista frente a la mediana de la intensidad de fluorescencia de la tinción CD86 dentro de una población de cDC (Figura 4A) y una población de pDC (Figura 4B) y monocitos (Figura 4C) utilizando el software Graph Pad Prism9.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

[098] El cáncer de piel suele localizarse superficialmente. El melanoma in

situ todavía está confinado a la epidermis y, por lo general, crece lentamente. Estas lesiones pueden tardar años en progresar hasta convertirse en un melanoma invasivo. El melanoma invasivo suele tener un componente epidérmico, pero ya no se limita a la epidermis, ya que las células del melanoma invaden la dermis. El cáncer metastásico suele estar profundamente localizado. Los datos se mostraron en WO 2017/004421 (incorporados aquí como referencia) demostrando que el resiquimod funciona en modelos de ratones transgénicos con lesiones pigmentadas *múltiples in vivo* y en un modelo de ratón de melanoma singénico que tienen un sistema inmunitario intacto. Estos datos mostraron que el resiquimod fue eficaz para inhibir o destruir las células tumorales melanocíticas en el nevo, la proliferación melanocítica intraepidérmica atípica y el melanoma. Además, los ratones tratados con resiquimod también redujeron significativamente el melanoma metastásico en los ganglios linfáticos, lo que indica que el resiquimod puede inhibir la metástasis de las células de melanoma. Además, WO 2017/004421 mostró que el resiquimod en combinación con la terapia sistémica anti-PD1 mejoró significativamente los efectos terapéuticos anti-PD1 en modelos de melanoma. Dado que el efecto del resiquimod en los tumores está mediado por la activación de las células T CD8 y la inhibición de las células supresoras derivadas de mieloides, el efecto del resiquimod no se limita a los tumores melanocíticos. También es eficaz en el tratamiento de otros cánceres epiteliales y el linfoma cutáneo de células T.

[099] Sin embargo, también en vista de la cizalla de infinitos tipos de cánceres y tumores, sigue siendo necesario contar con más compuestos para tratar el cáncer y otras enfermedades.

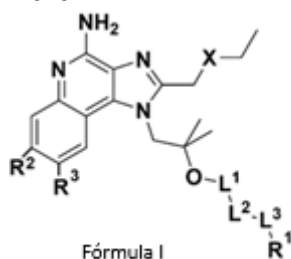
[0100] La Figura 1 muestra un análisis estructural de cocristales de TLR7 complejado con ligandos agonísticos como R848 (Shimizu et. al, Cell Reports 2018, 25, 3371). Inesperadamente, los inventores identificaron posibilidades de modificación en el grupo de hidrógeno no enterrado de R848. El sitio de unión agonístico en el

ectodominio de TLR7 se encuentra en el lisosoma celular. Por lo tanto, los inventores descubrieron que cualquier modificación con un grupo protonatable bajo un valor de pH bajo debería tener el potencial de mejorar el tiempo de retención del ligando agonista en el lisosoma. Los inventores razonaron que esto, a su vez, aumentará la unión entre dichos ligandos agonísticos y la proteína TLR7.

[0101] En consecuencia, los inventores sintetizaron una gran cantidad de diferentes agonistas de TLR7 que se basan en la imidazoquinolina. A partir de experimentos adicionales descritos en la sección de ejemplo a continuación, se confirmó, en consonancia con el razonamiento de los inventores, que el nuevo grupo de agonistas se desempeñó muy bien en experimentos basados en células.

[0102] Inesperadamente, en comparación con R484 y algunos agonistas de TLR7/8 reportados recientemente (Figura 2), estos nuevos agonistas de TLR7 (Figura 3) no solo mostraron muy buenas actividades en experimentos celulares de TLR7, sino que también exhibieron una alta selectividad entre TLR7 y TLR8. Más sorprendentemente aún, estos nuevos agonistas de TLR7 altamente selectivos iniciaron una alta producción de citocinas y quimiocinas (IL-6, IL1-b y TNF-a) e inducen una fuerte regulación positiva de CD40 y CD86 en un experimento de monocitos celulares (Figura 4).

[0103] En consecuencia, la invención proporciona en un primer aspecto un compuesto de acuerdo con **fórmula I**



[0104] o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,

[0105] donde X es un átomo de oxígeno, C1-C5-alkilo (preferiblemente CH₂) o NH;

[0106] donde R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, C1-C5-alquilo, C4-C7-cicloalquilo, C4-C7-heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo; preferiblemente tanto R^2 como R^3 son hidrógeno;

[0107] y en los que L^1 , L^2 , L^3 y R^1 se definen a continuación en las letras a) o b) o c):

[0108] (a) L^1 es alquilo C2-C6;

[0109] L^2 es un heterociclo de 5 o 6 miembros (preferiblemente triazol o piperazina), o OH; L^3 está ausente o seleccionado del grupo formado por hidrógeno, alquilo C1-C2 y $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2$; y

[0110] R^1 está ausente o se selecciona del grupo formado por hidrógeno, NH_2 , OH y SCH_3 ;

[0111] (b) L^1 es alquilo C2-C6;

[0112] L^2 se selecciona del grupo formado por $\text{C}(\text{O})$, $\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2$ y $\text{NHC}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_2$;

[0113] L^3 se selecciona del grupo formado por un heterociclo de 6 miembros, OH, $\text{C}(\text{O})\text{O}$, S, SO_2 y SO_3H ; y

[0114] R^1 está ausente o metilo o hidrógeno;

[0115] (c) L^1 es $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$;

[0116] L^2 es un heterociclo de 6 miembros o NH_2 ;

[0117] L^3 no está presente; y

[0118] R^1 es metilo o hidrógeno o está ausente;

[0119] y en el que si L^3 no está presente, entonces L^2 está directamente unido a través de un enlace covalente a R^1 .

[0120] En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención estimulan una respuesta inmune para el tratamiento del cáncer.

[0121] Antes de que los aspectos y realizaciones de la invención se describan con más detalle, a continuación se proporcionan ciertas definiciones que se

aplican a la invención divulgada en este documento a lo largo de toda la especificación, incluidas las reivindicaciones.

DEFINICIONES

[0122] A menos que se indique o defina lo contrario, todos los términos utilizados tienen su significado habitual en la técnica, que será claro para la persona experta. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales estándar, como Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Ed.) Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), F. Ausubel *et al.* (Current protocols in molecular biology, Green Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987), Lewin (Genes II, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1985), Old *et al.* (Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering (2ª edición) University of California Press, Berkeley, CA, 1981); Roitt *et al.* (Immunology (6ª Ed.) Mosby/Elsevier, Edinburgh, 2001), Roitt *et al.* (Roitt's Essential Immunology (10ª Ed.) Blackwell Publishing, UK, 2001), and Janeway *et al.* (Immunobiology (6ª Ed.) Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York, 2005), así como al estado general de la técnica citado en el presente documento.

[0123] A menos que se indique lo contrario, todos los métodos, pasos, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle se pueden realizar y se han realizado de una manera conocida *per se*, como quedará claro para la persona experta.

[0124] A menos que se indique otra cosa, se entenderá que la expresión "al menos" que precede a una serie de elementos se refiere a todos los elementos de la serie. Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar utilizando únicamente la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en este documento. Dichos equivalentes están destinados a ser abarcados por la presente invención.

[0125] El término "y/o", dondequiera que se utilice en el presente documento,

incluye el significado de "y", "o" y "todos o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término".

[0126] El término "aproximadamente" o "aproximadamente", tal como se utiliza en el presente documento, significa dentro del 20%, preferiblemente dentro del 15%, más preferiblemente dentro del 10% y más preferiblemente dentro del 5% de un valor o rango dado.

[0127] A lo largo de esta especificación y las afirmaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprende", y variaciones como "comprende" y "comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o paso o grupo de números enteros o pasos, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o paso o grupo de enteros o escalón. Cuando se utiliza en el presente documento, el término "comprende" puede sustituirse por el término "contiene" o "incluye" o, a veces, cuando se utiliza en el presente documento, con el término "teniendo".

[0128] "Agonista" se refiere a un compuesto que puede combinarse con un receptor (por ejemplo, un TLR) para inducir una actividad celular. Un agonista puede ser un ligando que se une directamente al receptor. Alternativamente, un agonista puede combinarse con un receptor indirectamente, por ejemplo, (a) formando un complejo con otra molécula que se une directamente al receptor, o (b) de otro modo resulta en la modificación de otro compuesto para que el otro compuesto se una directamente al receptor. Un agonista puede denominarse agonista de un TLR en particular (por ejemplo, un agonista de TLR6) o una combinación particular de TLR (por ejemplo, un agonista de TLR 7/8, un agonista de TLR7 y TLR8). "Mejora" se refiere a cualquier reducción en el alcance, la gravedad, la frecuencia y/o la probabilidad de un síntoma o signo clínico característico de una afección en particular.

[0129] La "actividad inmunitaria mediada por células" se refiere a una actividad biológica considerada parte de una respuesta inmunitaria mediada por

células, como, por ejemplo, un aumento en la producción de al menos una citocina TH1.

[0130] "Célula inmunitaria" se refiere a una célula del sistema inmunitario, es decir, una célula involucrada directa o indirectamente en la generación o el mantenimiento de una respuesta inmunitaria, ya sea innata, adquirida, humoral o mediada por células.

[0131] "Signo" o "signo clínico" se refiere a un hallazgo físico objetivo relacionado con una condición particular que puede ser encontrado por alguien que no sea el paciente.

[0132] "Síntoma" se refiere a cualquier evidencia subjetiva de enfermedad o de la condición de un paciente.

[0133] "Tratar" o variaciones del mismo se refiere a reducir, limitar la progresión, mejorar o resolver, en cualquier medida, los síntomas o signos relacionados con una afección.

[0134] "Potenciador de la penetración" y "mejora de la permeación", tal como se utilizan en el presente documento, se relacionan con un agente y el aumento de la permeabilidad del tejido a un fármaco, respectivamente, es decir, para aumentar la velocidad y el grado en que el fármaco penetra a través de un tejido como la piel o un tumor. El aumento de la permeabilidad efectuado mediante el uso de tales potenciadores puede observarse, por ejemplo, midiendo la tasa de difusión del fármaco a través de la piel animal o humana o el tejido tumoral utilizando un aparato celular de difusión o mediciones in situ. La célula de difusión es descrita por Merritt et al. Aparato de difusión para la penetración en la piel, J. de liberación controlada, 1 (1984) pp. 161 -162.

[0135] La "adyuvancia", tal como se utiliza aquí, se refiere a la capacidad de influir en una inflamación inespecífica o en una respuesta inmunitaria específica causada por un activador del sistema inmunitario.

[0136] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "respuesta anticancerosa" a la terapia se refiere a cualquier respuesta del cáncer a la terapia, preferiblemente a un cambio en la masa y/o el volumen del tumor después del inicio de la terapia. La respuesta al trastorno hiperproliferativo puede evaluarse cuando se compara el tamaño de un tumor después de una intervención tópica o sistémica con el tamaño y las dimensiones iniciales medidos por TC, PET, mamografía, ecografía o palpación. La respuesta también se puede evaluar mediante la medición con calibrador o el examen anatomopatológico del tumor después de una biopsia o una resección quirúrgica. La respuesta se puede registrar de manera cuantitativa, como el cambio porcentual en el volumen tumoral, o de manera cualitativa, como "respuesta patológica completa" (pCR), "remisión clínica completa" (cCR), "remisión clínica parcial" (cPR), "enfermedad clínica estable" (cSD), "enfermedad clínica progresiva" (cPD) u otros criterios cualitativos. La evaluación de la respuesta al trastorno hiperproliferativo puede realizarse temprano después del inicio del tratamiento, por ejemplo, después de unas horas, días, semanas o, preferiblemente, después de unos meses. Un criterio de valoración típico para la evaluación de la respuesta es la terminación de la quimioterapia o la extirpación quirúrgica de las células tumorales residuales o del lecho tumoral. Por lo general, esto ocurre tres meses después del inicio de la terapia.

[0137] Tal como se utiliza en este documento, "disminuir el tamaño de un tumor" se define como una reducción en el tamaño de un tumor. Este efecto puede lograrse reduciendo el número de células tumorales proliferantes en el tumor (por ejemplo, reduciendo la división celular de las células tumorales) y/o induciendo la citotoxicidad o la muerte celular (apoptosis) de las células tumorales existentes. En consecuencia, se detiene o previene el crecimiento tumoral.

[0138] Tal como se utiliza en este documento, el término "inhibir el cáncer" o "inhibir el crecimiento de células cancerosas" tiene la intención de incluir la inhibición

del crecimiento celular indeseable o inapropiado. La inhibición pretende incluir la inhibición de la proliferación, incluida la proliferación rápida. El término "inhibir el crecimiento de células cancerosas" también tiene la intención de abarcar la inhibición del crecimiento tumoral, que incluye la prevención del crecimiento de un tumor en un sujeto o una reducción en el crecimiento de un tumor preexistente en un sujeto. La inhibición también puede ser la inhibición de la metástasis de un tumor de un sitio a otro. Un cáncer se "inhibe" si al menos un síntoma del cáncer se alivia, se termina, se retrasa o se previene. Tal como se utiliza en el presente documento, el cáncer también se "inhibe" si la recurrencia o metástasis del cáncer se reduce, se retrasa, se retrasa o se previene.

[0139] "Compuesto terapéutico", "agente" y "agente terapéutico" se utilizan aquí como sinónimos.

[0140] Tal como se usan en este documento, "un", "el", "al menos uno" y "uno o más" se usan indistintamente. Así, por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende "un" compuesto modulador de la respuesta inmunitaria (IRM) puede interpretarse en el sentido de que la composición farmacéutica incluye al menos un compuesto IRM.

[0141] Tal como se utiliza en este documento, el término "sujeto" significará cualquier animal, incluidos, entre otros, un humano, un ratón, una rata, un conejo, un primate no humano o cualquier otro mamífero. En una realización, el sujeto es un primate. En otra y más preferida encarnación, el sujeto es un ser humano.

[0142] También en este documento, las recitaciones de rangos numéricos por puntos finales incluyen todos los números subsumidos dentro de ese rango (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1, 1.5, 2, 2.75, 3, 3.80, 4, 5, etc.). La composición de la invención puede, por ejemplo, comprender un compuesto de la invención en una cantidad de 0,01% -1% (vol/wt%).

[0143] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sinérgico"

se refiere a una combinación de agentes terapéuticos descritos en el presente documento, que, cuando se toman en conjunto, es más eficaz que los efectos aditivos de las terapias individuales. Un efecto sinérgico de una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de agentes terapéuticos) permite el uso de dosis más bajas de uno o más de los agentes terapéuticos y/o la administración menos frecuente de los agentes a un sujeto con una enfermedad o trastorno, por ejemplo, un trastorno proliferativo. La capacidad de utilizar dosis más bajas de uno o más agentes terapéuticos y/o de administrar el agente terapéutico con menos frecuencia reduce la toxicidad asociada con la administración del agente a un sujeto sin reducir la eficacia de la terapia en el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Además, un efecto sinérgico puede dar lugar a una mayor eficacia de los agentes en la prevención, el tratamiento o el tratamiento de una enfermedad o trastorno, por ejemplo, un trastorno proliferativo. Finalmente, un efecto sinérgico de una combinación de terapias puede evitar o reducir los efectos secundarios adversos o no deseados asociados con el uso de cualquiera de los agentes terapéuticos solos.

[0144] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "en combinación" puede referirse al uso de más de un agente terapéutico. El uso del término "en combinación" no restringe el orden en que se administran los agentes terapéuticos a un sujeto con una enfermedad o trastorno, por ejemplo, un trastorno proliferativo. Un primer agente terapéutico, como un compuesto descrito en este documento, puede administrarse antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas antes), concomitantemente o después de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas después) de

la administración de un segundo agente terapéutico, como un agente anticancerígeno, a un sujeto con una enfermedad o trastorno, por ejemplo, un trastorno proliferativo, como el cáncer.

[0145] Los modificadores de la respuesta inmunitaria (IRM, por sus siglas en inglés) incluyen compuestos que poseen una potente actividad inmunomoduladora, que incluye, entre otros, actividad antiviral y antitumoral. Ciertas IRM modulan la producción y secreción de citocinas. Por ejemplo, ciertos compuestos IRM inducen la producción y secreción de citocinas como, por ejemplo, interferones tipo I, TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, MUM y/o MCP-1. Como otro ejemplo, ciertos compuestos IRM pueden inhibir la producción y secreción de ciertas citocinas TH2, como IL-4 e IL-5.

[0146] Además, se dice que algunos compuestos IRM suprimen la IL-1 y el TNF (la Patente de EE. UU. N° 6.518.265). El resiquimod, (1-[4-amino-2-(etoximetil)imidazo[4,5-c]quinolina-1-il]-2-metilpropan-2-ol) es un modificador de la respuesta inmunitaria (IRM) que actúa estimulando las células a través de los receptores tipo toll (TLR) 7 y 8.

[0147] Tal como se utiliza en el presente documento, una "cantidad efectiva", cuando se utiliza con respecto al compuesto de la invención y con respecto a la combinación de agentes descritos en el presente documento, incluye, sin limitación, una cantidad del agente o de cada agente en la combinación que proporciona un efecto deseado estadísticamente significativo sobre la enfermedad o trastorno que se va a tratar (por ejemplo, cáncer). En este documento se describen los efectos representativos deseados. Por ejemplo, en el contexto del tratamiento del cáncer, el efecto puede ser una disminución en la tasa de crecimiento tumoral, un cese del crecimiento tumoral o una reducción en el tamaño, la masa, la actividad metabólica o el volumen del tumor, medido por criterios estándar como, entre otros, los Criterios de Evaluación de Respuesta para Tumores Sólidos (RECIST, por sus siglas en inglés),

Un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia en relación con el tratamiento con agentes individuales de la combinación o subcombinaciones de la combinación sola, y similares. La cantidad efectiva puede variar dependiendo de factores tales como el tipo de crecimiento celular que se está tratando o inhibiendo, el tipo de agente terapéutico (s) empleado(s), el agente terapéutico en particular, el tamaño del sujeto o la gravedad del crecimiento de células cancerosas o tumor. Por ejemplo, la elección de cada uno de los agentes individuales que componen la combinación puede afectar a lo que constituye una "cantidad efectiva". Una persona con habilidad ordinaria en la técnica sería capaz de estudiar los factores antes mencionados y tomar la determinación con respecto a la cantidad efectiva del compuesto terapéutico o la combinación de compuestos / agentes terapéuticos.

[0148] Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo in vitro para determinar una "cantidad efectiva" de los agentes terapéuticos. El artesano normalmente hábil seleccionaría una cantidad apropiada de cada agente individual en la combinación para su uso en el ensayo in vitro antes mencionado. La fracción de supervivencia celular se puede utilizar para determinar si las cantidades seleccionadas fueron una "cantidad efectiva" para la combinación particular de agentes terapéuticos. Por ejemplo, las cantidades seleccionadas utilizadas en el ensayo deben dar como resultado la muerte de al menos el 50% de las células, más preferiblemente el 75% y preferiblemente al menos el 95%. En una realización preferida, la dosis efectiva del agente terapéutico es una dosis subtóxica. Tal como se utiliza en este documento, el término dosis subtóxica se refiere a una dosis que resulta en la muerte de menos del 10% de las células.

[0149] El régimen (por ejemplo, el orden) de administración también puede afectar lo que constituye una cantidad efectiva. Además, se pueden administrar varias dosis divididas, así como dosis escalonadas, de forma tópica diaria o secuencial, o la dosis se puede infundir continuamente. Además, las dosis pueden aumentarse o

disminuirse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

[0150] La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos terapéuticos de la invención o combinaciones de compuestos/agentes terapéuticos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que, dentro del ámbito del buen juicio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

[0151] La frase "portador farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en el presente documento, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, como un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, solvente o material encapsulante, involucrado en el transporte o transporte de la sustancia química en cuestión de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano o porción del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás componentes de la formulación y no ser perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, como almidón de maíz y almidón de papa; (3) celulosa y sus derivados, como la carboximetilcelulosa de sodio, la etilcelulosa y el acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, como manteca de cacao y ceras de supositorios; (9) aceites, como el aceite de maní, el aceite de semilla de algodón, el aceite de cártamo, el aceite de sésamo, el aceite de oliva, el aceite de maíz y el aceite de soja; (10) glicoles, como el propilenglicol; (11) polioles, como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, como el oleato de etilo y el laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes amortiguadores, como el hidróxido de magnesio y el hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de

pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) Solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tampón de fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

[0152] Para los propósitos de esta invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75ª Ed. Además, los principios generales de la química orgánica se describen en "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, y "March's Advanced Organic Chemistry", 5ª ed., ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001, cuyo contenido íntegro se incorpora a título de referencia.

[0153] Tal como se usa en este documento, "alquilo" se refiere a un radical de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene un número específico de átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden ser no sustituidos o sustituidos por sustituyentes que no interfieran con la función especificada de la composición y pueden ser sustituidos una o dos veces con el mismo grupo o con uno diferente. Los sustituyentes pueden incluir alcoxi, hidroxilo, mercapto, amino, amino sustituido por alquilo, nitro, carboxi, carbonilo, carbonilo, ciano, metilsulfonilamina o halógeno, por ejemplo. Ejemplos de "alquilo" incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propil, isopropílico, n-butilo, s-butilo, t-butilo, n-pentilo, n-hexilo, 3-metilpentilo y similares. Un alquilo C1-C2, por ejemplo, incluye radicales metilo y etilo. Los hidrocarburos "alquilo", tal como se utilizan en el presente documento, incluyen radicales mono y bivalentes, es decir, incluyen radicales alquilenos, si la estructura resultante que comprende el grupo alquilo es estable.

[0154] El término "cicloalquilo", tal como se utiliza en este documento, se refiere a un sistema de anillos de hidrocarburos monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos saturados que tiene de tres a catorce átomos de carbono y cero heteroátomos. Ejemplos representativos de grupos cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a,

adamantilo, biciclo[3.1.1]heptilo, ciclobutilo, ciclohexilo, ciclopentilo y ciclopropilo.

[0155] El término "arilo" utilizado solo o como parte de una fracción más grande como en "aralilo", "araloxi" o "alquilo ariloxi", se refiere a los sistemas de anillos monocíclicos y bicíclicos que tienen un total de cinco a catorce miembros de anillo, en los que al menos un anillo del sistema es aromático y en el que cada anillo del sistema contiene de tres a siete miembros de anillo. El término "arilo" se utiliza indistintamente con el término "anillo de arilo". En ciertas realizaciones de la presente invención, "arilo" se refiere a un sistema de anillos aromáticos. Ejemplos representativos de grupos arilo son fenilo, bifenilo, naftilo, antracilo y similares, que opcionalmente incluyen uno o más sustituyentes. Preferiblemente, un grupo arilo no comprende sustituyentes. También se incluye dentro del ámbito del término "arilo", tal como se utiliza en el presente documento, un grupo en el que un anillo aromático se fusiona con uno o más anillos no aromáticos, como el indanilo, el ftalimidilo, el naftimidilo, el fenantrínilo o el tetrahidronaftil, y similares.

[0156] Los términos "heteroaril" y "heteroar-", usados solos o como parte de una fracción más grande, por ejemplo, "heteroaralkilo" o "heteroaraloxi", se refieren a grupos que tienen de 5 a 10 átomos de anillo, preferiblemente 5, 6 o 9 átomos de anillo; tener 6, 10 o 14 π electrones compartidos en una matriz cíclica; y que tengan, además de átomos de carbono, de uno a cinco heteroátomos. El término "heteroátomo" se refiere al nitrógeno, oxígeno o azufre, e incluye cualquier forma oxidada de nitrógeno o azufre, y cualquier forma cuaternizada de un nitrógeno básico. Los grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, tienilo, furanilo, pirrolilo, imidazolil, pirazolil, triazolil, tetrazolil, oxazolil, isoxazolil, oxadiazolil, tiazolil, isotiazolil, tiadiazolil, piridilo, piridazinil, pirimidinil, pirazinil, indolizinil, purinil, naftiridinil y pteridinil. Los términos "heteroarilo" y "heteroar-", según se utilizan en el presente documento, también comprenden grupos en los que un anillo heteroaromático está fusionado con uno o más anillos arilo, cicloalifáticos o heterocíclicos, donde el radical o punto de

unión se encuentra en el anillo heteroaromático. Algunos ejemplos no limitativos son el indolilo, el isoindolilo, el benzotienilo, el benzofuranilo, el dibenzofuranilo, el indazolilo, el benzimidazolilo, el benzotiazolilo, el quinolilo, el isoquinolilo, el cinolinilo, el ftalazinilo, el quinazolinilo, el quinoxalinilo, el 4H-quinolizinilo, el carbazolilo, el acridinilo, el fenazinilo, el fenotiazinilo, el fenoxazinilo, el tetrahydroquinolinilo, el tetrahydroisoquinolinilo y el pirido[2,3-b]-1,4-oxazin-3(4H)-ona. Un grupo heteroarilo es opcionalmente monocíclico o bicíclico. El término "heteroarilo" se utiliza indistintamente con los términos "anillo heteroarílico", "grupo heteroarílico" o "heteroaromático", cualquiera de los cuales términos incluye anillos que se sustituyen opcionalmente. El término "heteroaralquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido por un heteroarilo, en el cual las porciones alquilo y heteroarilo están, independientemente, opcionalmente sustituidas.

[0157] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "heterociclo", "heterociclilo", "radical heterocíclico" y "anillo heterocíclico" se usan de manera intercambiável y se refieren a una fracción heterocíclica estable, monocíclica de 5 a 7 miembros o bicíclica de 7 a 10 miembros, que puede estar saturada o parcialmente insaturada, y que contiene, además de átomos de carbono, uno o más, preferentemente de uno a cuatro, heteroátomos, según lo definido anteriormente. Cuando se usa en referencia a un átomo anular de un heterociclo, el término "nitrógeno" incluye un nitrógeno sustituido. Por ejemplo, en un anillo saturado o parcialmente insaturado que tiene 0-3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre o nitrógeno, el nitrógeno es N (como en 3,4-dihidro-2H-pirrolilo), NH (como en pirrolidinil) o +NR (como en pirrolidinil N-sustituido).

[0158] Un anillo heterocíclico se puede unir a su grupo colgante (o grupos colgantes) en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que resulte en una estructura estable y cualquiera de los átomos del anillo se puede sustituir opcionalmente (se prefieren los anillos no sustituidos). Ejemplos de dichos radicales

heterocíclicos saturados o parcialmente insaturados incluyen, sin limitación, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, pirrolidinilo, piperidinilo, pirrolinilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, oxazolidinilo, piperazinilo, dioxanilo, dioxolanilo, diazepinilo, oxazepinilo, tiazepinilo, morfolinilo y quinuclidinilo. Los términos "heterociclo", "heterocíclico", "anillo heterocíclico", "grupo heterocíclico", "fracción heterocíclica" y "radical heterocíclico" se utilizan indistintamente en este documento, y también incluyen grupos en los que un anillo heterocíclico se fusiona con uno o más anillos de arilo, heteroarilo o cicloalifáticos, como indolinilo, 3H-indolil, cromanilo, fenantridenilo o tetrahidroquinolinilo, donde el radical o punto de unión está en el anillo heterocíclico. Un grupo heteroarilo es opcionalmente monocíclico o bicíclico. El término "heterociclilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido por un heterocíclico, en el que las porciones de alquilo y heterocicilo de forma independiente se sustituyen opcionalmente (pero preferiblemente no se sustituyen).

[0159] Como se describe en este documento, ciertos compuestos de la invención contienen partes "opcionalmente sustituidas". En general, el término "sustituido", precedido o no por el término "opcionalmente", significa que uno o más hidrógenos de la fracción designada se sustituyen por un sustituyente adecuado. Cuando más de una posición en una estructura dada se sustituye con más de un sustituyente seleccionado de un grupo especificado, el sustituyente es el mismo o diferente en cada posición. Las combinaciones de sustituyentes previstas por esta invención son preferiblemente aquellas que dan lugar a la formación de compuestos estables o químicamente factibles. El término "estable", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a los compuestos que no se alteran sustancialmente cuando se someten a condiciones que permiten su producción, detección y, en ciertas realizaciones, su recuperación, purificación y uso para uno o más de los fines divulgados en este documento. Un compuesto "estable" normalmente no es un radical.

Preferiblemente, los compuestos de la invención no se sustituyen más allá de las sustituciones expresamente indicadas.

[0160] A menos que se indique lo contrario, la referencia a un compuesto y compuestos de la invención puede incluir el compuesto en cualquier forma farmacéuticamente aceptable o derivado farmacéuticamente aceptable, incluyendo cualquier isómero (por ejemplo, diastereómero o enantiómero), sal, éster, sal de un éster, solvato, polimorfo y similares. En particular, si un compuesto es ópticamente activo, la referencia al compuesto puede incluir cada uno de los enantiómeros del compuesto, así como mezclas racémicas de los enantiómeros. Además, a menos que se indique lo contrario, las estructuras y compuestos representados en este documento también están destinados a incluir compuestos que difieren solo en la presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, los compuestos que tienen las estructuras actuales, incluyendo la sustitución de hidrógeno por deuterio o tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido con ^{13}C o ^{14}C , están dentro del alcance de esta invención. En algunas realizaciones, el grupo comprende uno o más átomos de deuterio. Preferiblemente, una "sal, forma o derivado farmacéuticamente aceptable" incluye derivados de un compuesto de esta invención que, tras la administración a un receptor, es capaz de proporcionar, ya sea directa o indirectamente, un compuesto de esta invención o un metabolito agonístico o residuo del mismo.

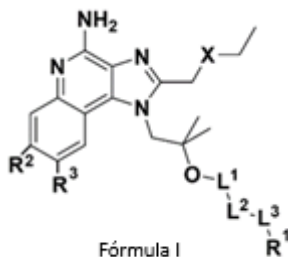
[0161] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que, dentro del ámbito del juicio médico sólido, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de humanos y animales inferiores sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica ni efectos similares, y que son compatibles con una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge et al., describen en detalle las sales farmacéuticamente

aceptables en *J. Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66, 1-19, incorporadas aquí como referencia. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen aquellas derivadas de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos adecuados. Ejemplos de sales de adición de ácido no tóxicas farmacéuticamente aceptables son sales de un grupo amino formadas con ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico, el ácido bromhídrico, el ácido fosfórico, el ácido sulfúrico y el ácido perclórico, o con ácidos orgánicos como el ácido acético, el ácido oxálico, el ácido maleico, el ácido tartárico, el ácido cítrico, el ácido succínico o el ácido malónico, o mediante el uso de otros métodos utilizados en la técnica, como el intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, sales de valerato y similares. Estas sales pueden prepararse in situ durante el aislamiento final y la purificación de los agentes terapéuticos, o haciendo reaccionar por separado un agente terapéutico purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal así formada. Las sales representativas también incluyen el bromuro, el clorhidrato, el sulfato, el bisulfato, el fosfato, el nitrato, el acetato, el valerato, el oleato, el palmitato, el estearato, el laurato, el benzoato, el lactato, el fosfato, el tosilato, el citrato, el maleato, el fumarato, el succinato, el tartrato, el natilato, el mesilato, el glucoheptonato, el lactobionato y las sales de laurilsulfonato y similares. (Véase, por ejemplo, Berge et al. (1977))

“Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 66: 1- 19).

[0162] Las sales derivadas de las bases apropiadas incluyen metales alcalinos, metales alcalinotérreos, amonio y sales de $N^+(C1-4\text{alquilo})_4$. Las sales metálicas alcalinas o alcalinotérreas representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen, cuando corresponda, amonio no tóxico, amonio cuaternario y cationes de amina formados con contraiones como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato de alquilo y sulfonato de arilo.

[0163] Por lo tanto, en un primer aspecto la invención proporciona un compuesto de acuerdo con **fórmula I**



[0164] o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado de la misma,

[0165] donde X es un átomo de oxígeno, C1-C5-alquilo (preferiblemente CH_2) o NH;

[0166] donde R^2 y R^3 se seleccionan independientemente del grupo formado por hidrógeno, C1-C5-alquilo, C4-C7-cicloalquilo, C4-C7-heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo; preferiblemente tanto R^2 como R^3 son hidrógeno;

[0167] y en los que L^1 , L^2 , L^3 y R^1 se definen a continuación en las letras a) o b) o c):

[0168] (a) L^1 es alquilo C2-C6;

[0169] L^2 es un heterociclo de 5 o 6 miembros o OH; L^3 está ausente o seleccionado del grupo formado por hidrógeno, alquilo C1-C2 y $CH_2C(CH_3)_2$; y

[0170] R^1 está ausente o se selecciona del grupo formado por hidrógeno, NH_2 , OH y SCH_3 ;

[0171] (b) L^1 es alquilo C2-C6;

[0172] L^2 se selecciona del grupo formado por $C(O)$, $NHC(O)CH_2$ y $NHC(O)C(CH_3)_2$;

[0173] L^3 se selecciona del grupo formado por un heterociclo de 6 miembros, OH , $C(O)O$, S , SO_2 y SO_3H ; y

[0174] R^1 está ausente o metilo o hidrógeno;

[0175] (c) L^1 es $C(O)CH_2$;

[0176] L^2 es un heterociclo de 6 miembros o NH_2 ;

[0177] L^3 no está presente; y

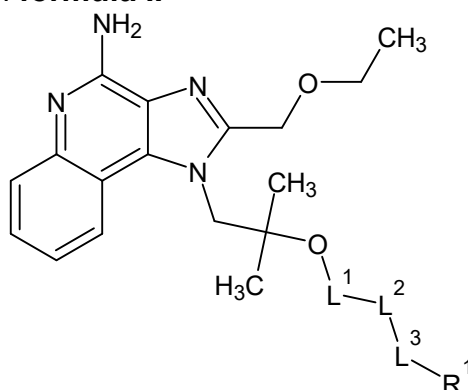
[0178] R^1 es metilo o hidrógeno o está ausente;

[0179] y en el que si L^3 no está presente, entonces L^2 está directamente unido a través de un enlace covalente a R^1 .

[0180] En una realización preferida del primer aspecto, R^2 y R^3 son hidrógeno.

[0181] Preferiblemente, X en el compuesto de la invención es un átomo de oxígeno.

[0182] En una realización adicional, el compuesto de la invención tiene una estructura de acuerdo con **fórmula II**



Fórmula II

[0183] donde L^1 , L^2 , L^3 y R^1 son los que se definen a continuación en las letras d), e) o f)

[0184] (d) L¹ es alquilo C2-C6 (por ejemplo, etilo, propilo, butilo, pentilo o hexilo);

[0185] L² es un heterociclo de 5 o 6 miembros (preferiblemente triazol o piperazina), o OH; L³ está ausente o seleccionado del grupo formado por hidrógeno, alquilo C1-C2 y CH₂C(CH₃)₂; y

[0186] R¹ está ausente o se selecciona del grupo formado por hidrógeno, NH₂, OH y SCH₃;

[0187] (e) L¹ es alquilo C2-C3;

[0188] L² se selecciona del grupo formado por C(O), NHC(O)CH₂ y NHC(O)C(CH₃)₂;

[0189] L³ se selecciona del grupo formado por un heterociclo de 6 miembros (preferiblemente piperazina), OH, C(O)O, S, SO₂ y SO₃H; y

[0190] R¹ está ausente o metilo o hidrógeno;

[0191] (f) L¹ es C(O)CH₂;

[0192] L² es un heterociclo de 6 miembros (preferiblemente piperazina) o NH₂;

[0193] L³ no está presente; y

[0194] R¹ es metilo o hidrógeno o está ausente;

[0195] En realizaciones más preferidas de un compuesto con la Fórmula I o II de la invención

[0196] L¹ es alquilo C2-C4.

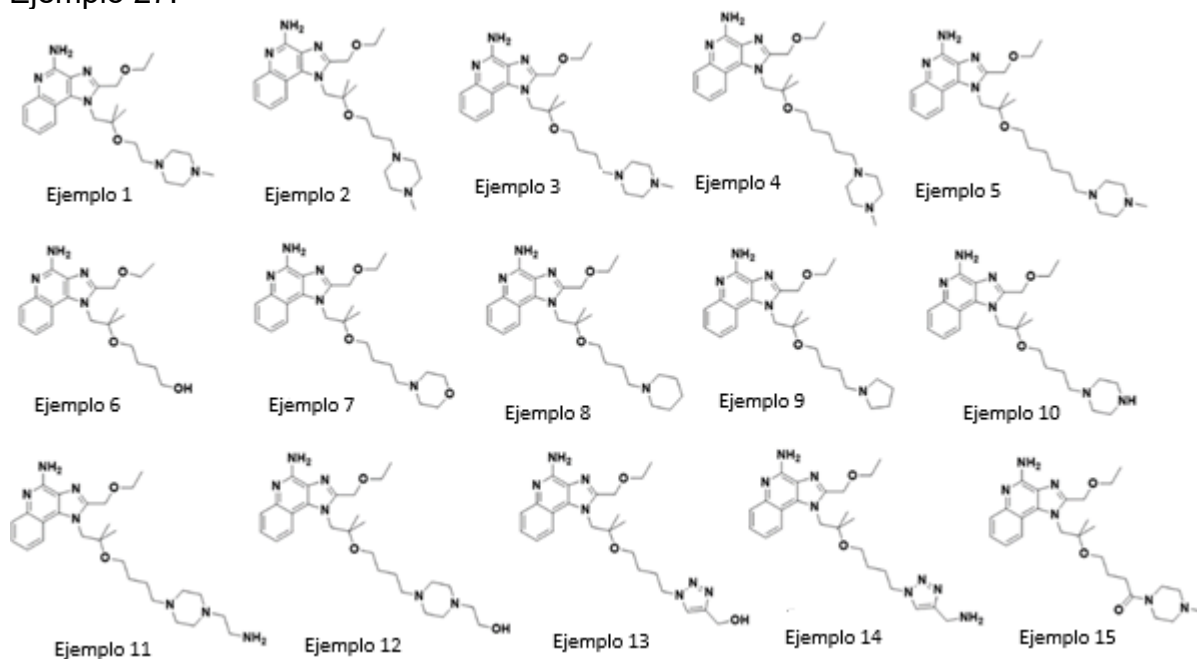
[0197] En una realización preferida de un compuesto con la Fórmula II de la invención

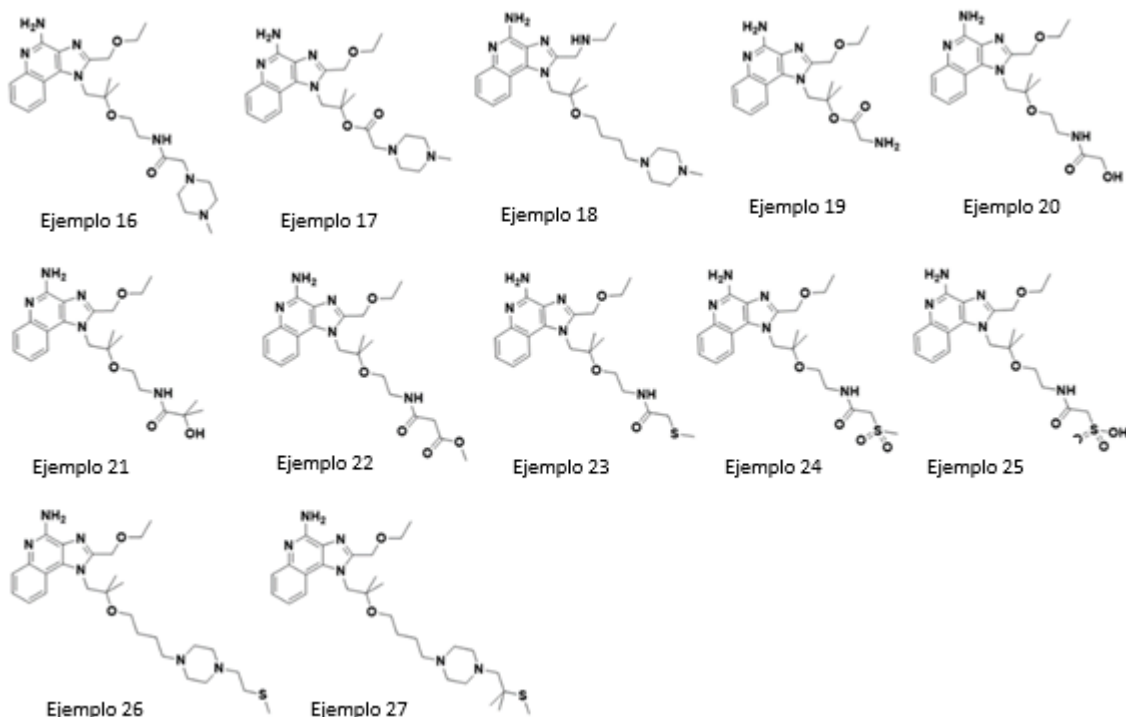
[0198] L¹ es alquilo C2-C6 (preferiblemente alquilo C2-C4);

[0199] L² es un heterociclo de 5 o 6 miembros (preferiblemente triazol o piperazina), o OH; L³ está ausente o seleccionado del grupo formado por hidrógeno, alquilo C1-C2 y CH₂C(CH₃)₂; y

[0200] R^1 está ausente o se selecciona del grupo formado por NH_2 , OH y SCH_3 ;

[0201] En una realización preferida de particularidad del compuesto de la invención, el compuesto tiene una estructura seleccionada del grupo que consta de las estructuras enumeradas a continuación que se designan como Ejemplo 1 a Ejemplo 27:





[0202] En las realizaciones preferidas de la invención, el compuesto de la invención es un compuesto según el Ejemplo 13 o 14 como se ha descrito anteriormente, o según el Ejemplo 26 o 27 como se ha descrito anteriormente.

[0203] En realizaciones preferidas, el compuesto de la invención es un compuesto que se selecciona del grupo que consta de compuestos de los Ejemplos 1 a 6 como se describe anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado de la misma. En la mayoría de las realizaciones preferidas, el compuesto de la invención es un compuesto seleccionado del grupo que consta de los Ejemplos 1, 3, 4 y 5 como se describe anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado de la misma.

[0204] Otro compuesto preferido de la invención se refiere a un compuesto en el que

[0205] X es NH;

[0206] L¹ es alquilo C2-C6;

[0207] L² es un heterociclo de 5 o 6 miembros;

[0208] L³ no está presente; y

[0209] R¹ es metilo o hidrógeno; y

[0210] R² y R³ son hidrógeno.

[0211] También se prefiere un compuesto de la invención en el que el compuesto

[0212] (i) activa TLR7 con más fuerza que TLR8; y/o

[0213] (ii) induce la producción de IL-6, IL1-b y TNF- α ; y/o

[0214] (iii) induce la regulación positiva de CD40 y/o CD86 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

[0215] En la realización anterior, la persona experta promedio puede probar si un compuesto activa TLR7 más fuertemente que TLR8 llevando a cabo el método proporcionado a continuación en el Ejemplo 6.2.1.

[0216] En la realización anterior, la persona cualificada promedio puede probar si un compuesto induce la producción de TNF- α llevando a cabo el método proporcionado a continuación en el Ejemplo 6.2.2.

[0217] En la realización anterior, la persona experta promedio puede probar si un compuesto induce una regulación positiva de CD86 llevando a cabo el método proporcionado a continuación en el Ejemplo 6.2.3.

[0218] También se prefiere un compuesto según la invención, en el que el compuesto induce la secreción de TNF α de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) si el compuesto entra en contacto con dichas células.

[0219] También se prefiere un compuesto de acuerdo con la invención, en el que el compuesto tiene para TLR7 un EC50 de menos de 10 μ M y preferiblemente menos de 0,01 μ M, preferiblemente cuando se prueba en un sistema de prueba descrito en el Ejemplo 6.2.1 a continuación.

[0220] Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención.

[0221] La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que

comprenden el compuesto de la invención y preferiblemente un compuesto adicional como imiquimod y/o resiquimod (R848).

[0222] Un aspecto adicional de la invención se refiere a un compuesto de la invención para su uso como medicamento.

[0223] Un aspecto adicional de la invención se refiere a un compuesto de la invención para el uso en el tratamiento de una enfermedad en el que dicho compuesto se utiliza en dicho tratamiento en combinación con los compuestos adicionales imiquimod y/o resiquimod (R848).

[0224] Las realizaciones preferidas proporcionan un compuesto de la invención para el uso en el tratamiento de una condición seleccionada del grupo que consiste en cáncer, una infección viral, lesiones cutáneas no cancerosas, lesiones cutáneas precancerosas, lesiones cutáneas cancerosas, cáncer de vejiga, enfermedad cutánea mediada por virus, siendo dicha composición opcionalmente formulada para una penetración mejorada después de la administración tópica, dicha composición preferiblemente iniciando una respuesta de citocina inflamatoria específica local mientras limita eritema indeseable y otras reacciones inflamatorias.

[0225] En realizaciones preferidas de la composición de la invención, el compuesto de la invención está comprendido en una cantidad de entre 0,01% -1% wt/vol.

[0226] Un aspecto adicional se refiere a una composición de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer de vejiga, en la que la composición está formulada para la administración intraquística.

[0227] En realizaciones preferidas de la composición de la invención, la invención comprende además componentes adicionales de uno de los grupos i a xiii descritos a continuación:

[0228] i. Ácido oleico (50 %) y miristato de isopropilo (50 %) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una

concentración total del 1 % en peso/vol, o

[0229] ii. Miristato de isopropilo (50%) y lauril sulfato de sodio (50%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 0,5% en peso/vol, o iii. Ácido oleico (50%) y lauril sulfato de sodio (50%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 0,5% en peso/vol, o iv. Ácido oleico (33 %), miristato de isopropilo (33 %) y lauril sulfato de sodio (33 %) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total del 0,5 % en peso/vol, o

[0230] v. Palmitato de isopropilo (50%) y oleato de sodio (50%) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total del 2% en peso/vol, o

[0231] vi. Lauril sulfato de sodio (25%) y ácido linoleico (75%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 1,0% en peso/vol, o vii. Ácido palmítico (50 %) y laurato de isopropilo (50 %) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total del 2,0 % en peso/vol, o

[0232] viii. Ácido oleico (50 %) y ácido linoleico (50 %) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 1,5 % en peso/vol, o

[0233] ix. Ácido linoleico (25 %), ácido oleico (25 %) y linoleato de isopropilo (50 %) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 0,5 % en peso/vol, o

[0234] x. Oleato de sodio (33 %), ácido oleico (33 %) y palmitato de metilo (33 %) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 2,0 % en peso/vol, o

[0235] xi. Una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol, o

[0236] xii. Ácido oleico (10 %) en una solución que contenga 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol, o

[0237] xiii. Ácido oleico (2%) y lauril sulfato de sodio (5%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol.

[0238] Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para el tratamiento de un cáncer, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la invención al sujeto que padece cáncer.

[0239] Sin embargo, un aspecto adicional de la invención proporciona un método para el tratamiento de la lesión tumoral de la piel y la enfermedad de la piel inducida por virus, que comprende la administración tópica de la composición de la invención, siendo dicha composición preferiblemente eficaz para reducir o eliminar dicha lesión o enfermedad al tiempo que limita las reacciones adversas de la piel seleccionadas del eritema y la inflamación, dicha composición reduce preferiblemente la penetración de la lesión tumoral en el tejido circundante y la metástasis en los ganglios linfáticos.

[0240] Sin embargo, un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para el tratamiento del tumor de vejiga, que comprende la administración intraquística de la composición de la invención, dicha composición mejora preferiblemente la permeación y la entrega de resiquimod al epitelio vesical al tiempo que limita la irritación, dicha composición reduce preferiblemente la invasión tumoral al tejido muscular circundante y la metástasis a los ganglios linfáticos.

[0241] En realizaciones preferidas del método de la invención, dicho tratamiento comprende además la administración sistémica a dicho sujeto de al menos un modulador inmune seleccionado entre anti-PD1, anti-PD-L1, anticuerpo anti-CTLA-4, anticuerpo anti-CD137, anticuerpo CD40 agonístico, agonista CD134 (Anti-OX40)

y PLX3397.

[0242] En realizaciones preferidas del método de la invención, dicho tratamiento comprende además la administración sistémica a dicho sujeto de interferón gamma.

[0243] En realizaciones preferidas del método de la invención, dicho tratamiento comprende además la administración de radiación local con o sin anticuerpo anti-PD1 sistémico.

[0244] En realizaciones preferidas del método de la invención, dicho tratamiento comprende además la administración de terapia fotodinámica.

[0245] En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de activación de TLR 7 y/o 8 en una muestra biológica, que comprende el contacto de dicha muestra biológica con un compuesto de acuerdo con la invención.

[0246] En un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto de la invención para su uso como adyuvante de vacuna o para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con un agente de inmunoterapia anticancerígeno (preferiblemente ipilimumab, nivolumab o pembrolizumab).

PREPARACIÓN

[0247] Los compuestos agonistas TLR7 de la invención pueden prepararse siguiendo los ejemplos que se proporcionan más abajo. También se pueden emplear métodos alternativos para sintetizar los compuestos de la invención.

USOS, FORMULACIÓN Y ADMINISTRACIÓN

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAMENTE ACEPTABLES

[0248] Los compuestos de la invención actuarán como modificadores de la respuesta inmune, y tendrán actividad antiviral y antitumoral. Por ejemplo, al igual que el resiquimod, que es un agonista del receptor tipo toll 7 (TLR7), se espera que los compuestos de la invención, tal y como se demostró para el resiquimod en un estudio clínico de fase 2, reduzcan la infección por el virus de la hepatitis C (VHC). En un

modelo murino de asma alérgica, el resiquimod (es decir, 20 µg/ratón) reduce la reactividad y la inflamación de las vías respiratorias inducidas por alérgenos mediante la reducción de la señalización de Nrf2 (Int J Biochem Cell Biol. 2016 Apr;73:53-62. doi: 10.1016/j.biocel.2016.02.004. Epub 2016 Feb 3). Resiquimod también modula las células dendríticas para aumentar las respuestas de las células T específicas del citomegalovirus y del VIH-1 (J Immunol. 2003 Oct 15;171(8):4320-8. doi: 10.4049/jimmunol.171.8.4320). El resiquimod también induce la diferenciación de las células supresoras derivadas de mieloides en macrófagos y células dendríticas, y puede mejorar la inmunoterapia contra el cáncer al reducir las MDSC inmunosupresoras (ver Arch Pharm Res. 2014;37(9):1234-40. doi: 10.1007/s12272-014-0379-4. Epub 2014 Apr 19.). En vista de estos múltiples beneficios médicos que se han demostrado para el resiquimod como agonista de TLR7/8, se espera que los compuestos de la invención, que también son agonistas de TLR7/8, compartan los usos y beneficios médicos antes mencionados.

[0249] Como se muestra en los ejemplos, los compuestos de la invención son, al igual que el resiquimod, también agonistas de los receptores tipo toll 7 y 8. En consecuencia, en un aspecto adicional, la invención proporciona una composición que comprende un compuesto de esta invención o un derivado farmacéuticamente aceptable de la misma y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la cantidad de un compuesto de la invención en las composiciones de esta invención es tal que es efectiva para activar de manera mensurable TLR7/8, o un mutante del mismo, en una muestra biológica o en un paciente. En ciertas realizaciones, se formula una composición de esta invención para su administración a un paciente que necesite dicha composición.

[0250] El término "paciente" o "sujeto", tal como se utiliza en el presente documento, significa un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ser humano.

[0251] El término “vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable” incluye vehículos, adyuvantes o excipientes no tóxicos que no destruyen la actividad farmacológica del compuesto con el que se formulan. Los vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables que se utilizan en las composiciones de esta invención incluyen, entre otros, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas como la albúmina sérica humana, sustancias tampón como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de mono- y diglicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos como sulfato de protamina, fosfato disódico, fosfato monopotásico, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, copolímeros en bloque de polietileno y polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

[0252] Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, por pulverización por inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un reservorio implantado. El término “parenteral”, tal como se utiliza en el presente documento, incluye las técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, esternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Preferentemente, las composiciones se administran por vía oral, intraperitoneal o intravenosa. Sterile injectable forms of the compositions of this invention include aqueous or oleaginous suspension. Estas suspensiones se formulan de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica utilizando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable estéril o una suspensión en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable por vía parenteral, por ejemplo, en forma de solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden usar se encuentran el agua, la

solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites estériles y fijos pueden emplearse convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Un aceite fijo que se puede emplear incluye mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, como el ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietilados. Estas soluciones o suspensiones de aceite también contienen un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas farmacéuticas aceptables, incluidas emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos de uso común, como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas u otras formas farmacéuticas aceptables, también se pueden usar para fines de formulación.

[0253] Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención pueden en una realización administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral. Las formas farmacéuticas orales ejemplares son cápsulas, tabletas, suspensiones acuosas o soluciones. En el caso de las tabletas de uso oral, los excipientes más utilizados son la lactosa y el almidón de maíz. También se suelen añadir agentes lubricantes, como el estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsulas, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el principio activo puede combinarse con agentes emulsionantes y suspensores. Si se desea, también se pueden añadir opcionalmente ciertos agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes.

[0254] Alternativamente, las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención pueden administrarse en forma de supositorios para la

administración rectal. Estos se pueden preparar mezclando el agente con un excipiente adecuado no irritante que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal y, por lo tanto, se derretirá en el recto para liberar el medicamento. Dichos materiales incluyen manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

[0255] Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención también pueden administrarse por vía tópica, especialmente cuando el objetivo del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica, incluidas las enfermedades de los ojos, la piel o el tracto intestinal inferior. Se preparan fácilmente formulaciones tópicas adecuadas para cada una de estas áreas u órganos.

[0256] La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior se puede realizar en una formulación de supositorio rectal (ver arriba) o en una formulación de enema adecuada. También se pueden utilizar parches transdérmicos tópicos.

[0257] Para aplicaciones tópicas, siempre que las composiciones farmacéuticamente aceptables de la invención puedan formularse en un ungüento adecuado que contenga el compuesto activo de la invención suspendido o disuelto en uno o más portadores. Los portadores ejemplares para la administración tópica de compuestos de este incluyen aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, siempre que las composiciones farmacéuticamente aceptables puedan formularse en una loción o crema adecuada que contenga los componentes activos suspendidos o disueltos en uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Los portadores adecuados incluyen, entre otros, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

[0258] Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención se administran opcionalmente por aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones pueden prepararse de acuerdo con técnicas bien conocidas en el arte de la

formulación farmacéutica y se preparan como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales. Como se ha mencionado, las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención también pueden formularse para la administración oral. Tales formulaciones pueden administrarse con o sin alimentos. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención se administran sin alimentos. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención se administran con alimentos.

[0259] La cantidad de compuestos de la presente invención que se combinan opcionalmente con materiales vehiculares para producir una composición en una única forma de dosificación variará según el huésped tratado y el modo particular de administración. Preferiblemente, las composiciones proporcionadas pueden formularse de manera que se pueda administrar una dosis de entre 0,01 - 100 mg/kg de peso corporal/día del compuesto a un paciente que reciba estas composiciones.

[0260] También debe entenderse que la dosis específica y el régimen de tratamiento para cualquier paciente en particular dependerán de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico utilizado, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la velocidad de excreción, la combinación con otros medicamentos, el criterio del médico tratante y la gravedad de la enfermedad que se esté tratando. La cantidad de un compuesto de la presente invención en la composición también dependerá del compuesto específico presente en dicha composición.

[0261] Los pacientes inmunodeprimidos son muy susceptibles al desarrollo de una infección grave que a menudo progresa a la condición potencialmente mortal de sepsis. Así, las inmunoterapias dirigidas a reforzar las defensas inmunitarias del

huésped son estrategias muy atractivas para evitar la infección y proteger a los pacientes. Recientemente, ha habido una creciente evidencia de que la activación del sistema inmune innato puede conferir una reprogramación funcional a largo plazo mediante la cual los leucocitos innatos montan respuestas más robustas tras la exposición secundaria a un patógeno para una eliminación y protección del huésped más eficientes, lo que se denomina inmunidad entrenada. Los agonistas del receptor tipo Toll (TLR) son una clase de agentes que se ha demostrado que desencadenan el fenómeno de la inmunidad entrenada a través de la reprogramación metabólica y las modificaciones epigenéticas que impulsan un aumento profundo de las funciones antimicrobianas. Los agonistas inmunomoduladores de TLR también son muy beneficiosos como adyuvantes de vacunas. Además, la mayoría de los antígenos asociados al cáncer son autoantígenos y requieren adyuvantes inmunoestimulantes, además de estrategias dirigidas al cáncer. Por lo tanto, los agonistas de TLR7/8 como los compuestos de la invención también serán útiles en el tratamiento del cáncer.

[0262] En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto que sufre de un trastorno relacionado con TLR7/8, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad efectiva de un compuesto de la invención, preferiblemente un compuesto de fórmula II y fórmulas relacionadas.

[0263] Los compuestos de la presente invención son útiles como agentes anticancerígenos para cánceres que responden a la activación de TLR7. En ciertas realizaciones, los cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, vejiga, hueso, cerebro, sistema nervioso central y periférico, colon, glándulas endocrinas, esófago, endometrio, células germinales, cabeza y cuello, riñón, hígado, pulmón, laringe e hipofaringe, mesotelioma, sarcoma, ovario, páncreas, próstata, recto, riñón, intestino delgado, tejido blando, testículo, estómago, piel, uréter, vagina y vulva; cánceres hereditarios, retinoblastoma y tumor de Wilms; leucemia, linfoma, enfermedad no Hodgkins, leucemia mieloide crónica y aguda, leucemia linfoblástica

aguda, enfermedad de Hodgkins, mieloma múltiple y linfoma de células T; síndrome mielodisplásico, neoplasia de células plasmáticas, síndromes paraneoplásicos, cánceres de sitio primario desconocido y neoplasias malignas relacionadas con el SIDA.

[0264] En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención se utilizan para tratar cánceres de piel o riñón. La sensibilidad de un determinado tipo de cáncer a la activación de TLR7 puede evaluarse, aunque no se limita a ello, mediante la medición de una disminución de la carga tumoral primaria o metastásica (regresión menor, parcial o completa), alteraciones en el hemograma, concentraciones alteradas de hormonas o citocinas en sangre, inhibición de un aumento posterior de la carga tumoral, estabilización de la enfermedad en el paciente, evaluación de biomarcadores o marcadores sustitutos relevantes para la enfermedad, prolongación de la supervivencia global del paciente, prolongación del tiempo hasta la progresión de la enfermedad, prolongación de la supervivencia libre de progresión, prolongación de la supervivencia libre de enfermedad, mejora de la calidad de vida del paciente o modulación de la comorbilidad de la enfermedad (por ejemplo, pero sin limitarse a ello, dolor, caquexia, movilidad, hospitalización, alteración del hemograma, pérdida de peso, cicatrización de heridas, fiebre).

[0265] Los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden ser útiles adicionalmente como modificadores de la respuesta inmune que pueden modular la respuesta inmune de varias maneras diferentes, lo que los hace útiles en el tratamiento de una variedad de trastornos.

[0266] En este documento se proporcionan métodos para activar una respuesta inmune en un individuo que comprenden la administración al individuo de una cantidad efectiva de un activador de TLR7 (por ejemplo, activador de TLR7), utilizando un compuesto como se describe en este documento. En algunas variaciones, el activador de TLR activa una respuesta inmunitaria dependiente de

TLR7. En algunas variaciones, el activador de TLR activa una respuesta inmunitaria dependiente de TLR7 y TLR8. A menos que se indique lo contrario, el término activador de TLR se refiere a cualquiera de los compuestos de la invención divulgados en este documento. En algunas realizaciones preferidas, el individuo es un paciente humano.

[0267] Los métodos de inmunorregulación se proporcionan en la presente divulgación e incluyen aquellos que activan una respuesta inmunitaria, incluida, entre otras, una respuesta inmunitaria. La presente divulgación también proporciona métodos para activar una respuesta inducida por TLR7 y/o TLR8 (por ejemplo, in vitro o in vivo). En algunas variaciones, la célula entra en contacto con el activador de TLR en una cantidad eficaz para activar una respuesta de la célula que contribuye a una respuesta inmunitaria.

[0268] La activación de TLR7 y/o TLR8 es útil para tratar y/o prevenir una variedad de enfermedades o trastornos que responden a las citocinas.

[0269] En este documento se proporcionan métodos para activar una respuesta inmunitaria en un individuo, el método comprende la administración al individuo de al menos un activador de TLR, como se describe en este documento, en una cantidad efectiva para activar la respuesta inmunitaria en el individuo.

[0270] En este documento también se proporcionan métodos para tratar una enfermedad o trastorno viral, por ejemplo, una infección por VIH, el método que comprende la administración al individuo de al menos un compuesto de la invención en una cantidad efectiva para tratar la enfermedad o trastorno viral.

[0271] En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos que implican la administración de un compuesto de la invención a un sujeto, el compuesto tiene preferiblemente un perfil de seguridad terapéuticamente aceptable. El activador compuesto/TLR puede, por ejemplo, tener un perfil histológico terapéuticamente aceptable que incluya una toxicidad aceptablemente baja, si es que la hay, para el

hígado, el riñón, el páncreas u otros órganos. En algunas realizaciones, un perfil de seguridad incluye la evaluación de la toxicidad, el perfil histológico y/o la necrosis (por ejemplo, hígado, riñones y/o corazón). En algunas realizaciones, el activador TLR tiene un nivel terapéuticamente aceptable de toxicidad. En algunas realizaciones, el activador de TLR tiene un nivel reducido de toxicidad en comparación con otro activador de TLR. En algunas realizaciones, el activador de TLR induce una reducción terapéuticamente aceptable en el peso corporal en comparación con el peso corporal inicial de un individuo tratado. En algunas realizaciones, el activador TLR induce una reducción inferior al 5%, 7,5%, 10%, 12,5 o 15% en el peso corporal total. En algunas realizaciones, el activador de TLR tiene un perfil histológico terapéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el activador de TLR tiene un mejor perfil histológico (por ejemplo, una puntuación de gravedad más baja), por ejemplo, en comparación con un activador de TLR de referencia. En algunas realizaciones, el activador de TLR tiene un mejor perfil histológico (por ejemplo, una puntuación de gravedad más baja) tras la evaluación del hígado, los riñones y/o el corazón, por ejemplo. En algunas realizaciones, el activador TLR tiene una puntuación de necrosis terapéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el activador de TLR tiene una necrosis reducida y/o una mejor puntuación de necrosis (por ejemplo, más baja), en comparación con un activador de TLR de referencia. En algunas realizaciones, el activador de TLR tiene una necrosis renal y/o hepatocelular reducida y/o una mejor puntuación de necrosis renal y/o hepatocelular, por ejemplo, en comparación con un activador de TLR de referencia.

[0272] En consecuencia, la invención proporciona un método para activar TLR7 en un animal, especialmente en un mamífero, preferiblemente un ser humano, que administra una cantidad efectiva de un compuesto de la invención al animal. Una cantidad efectiva de un compuesto variará de acuerdo con los factores conocidos en la técnica, pero se espera que sea una dosis de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg,

0,5 a 10 mg/kg, 1 a 10 mg/kg, 0,1 a 20 mg/kg, 0,1 a 20 mg/kg o 1 a 20 mg/kg.

[0273] La invención también proporciona un método para tratar una infección viral en un animal que comprende la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de la invención al animal. Una cantidad efectiva para tratar o inhibir una infección viral es una cantidad que causará una reducción en una o más de las manifestaciones de la infección viral, como lesiones virales, carga viral, tasa de producción de virus y mortalidad en comparación con los animales de control no tratados. La cantidad exacta variará de acuerdo con los factores conocidos en la técnica, pero se espera que sea una dosis como se indicó anteriormente con respecto a la activación de TLR7, o una dosis de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 50 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 5 mg/kg.

[0274] El procedimiento de la invención puede realizarse in vitro o in vivo. La susceptibilidad de una célula particular al tratamiento con los compuestos de acuerdo con la invención puede determinarse particularmente mediante pruebas in vitro, ya sea en el curso de la investigación o de la aplicación clínica. Típicamente, un cultivo de la célula se combina con un compuesto de acuerdo con la invención a varias concentraciones durante un período de tiempo que es suficiente para permitir que los agentes activos inhiban la actividad de TLR7/8, generalmente entre aproximadamente una hora y una semana. El tratamiento in vitro puede llevarse a cabo utilizando células cultivadas a partir de una muestra de biopsia o de una línea celular.

[0275] El huésped o paciente puede pertenecer a cualquier especie de mamífero, por ejemplo, una especie de primate, particularmente humanos; roedores, incluidos ratones, ratas y hámsters; conejos; caballos, vacas, perros, gatos, etc. Los modelos animales son de interés para las investigaciones experimentales, ya que proporcionan un modelo para el tratamiento de enfermedades humanas.

[0276] Además, la invención también proporciona el uso de los compuestos

según la invención y sus derivados para la producción de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad causada, mediada y/o propagada por una actividad insuficiente de TLR7/8. En ciertas realizaciones, la invención proporciona el uso de un compuesto de acuerdo con la invención o sales fisiológicamente aceptables o derivados de los mismos, para la producción de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un trastorno mediado por TLR7/8. Los compuestos de la invención y/o una sal fisiológicamente aceptable o un derivado de la misma pueden emplearse además como intermedios para la preparación de otros ingredientes activos de medicamentos. El medicamento se prepara preferentemente de manera no química, por ejemplo, combinando el principio activo con al menos un excipiente o vehículo sólido, fluido y/o semilíquido, y opcionalmente en conjunto con una o más otras sustancias activas en una forma farmacéutica adecuada.

[0277] Los compuestos de la invención pueden en una realización ser administrados antes o después de la aparición de una enfermedad una o varias veces actuando como terapia. Los compuestos se utilizan especialmente para el tratamiento terapéutico. Un efecto terapéuticamente relevante alivia hasta cierto punto uno o más síntomas de un trastorno, o devuelve a la normalidad, ya sea parcial o totalmente, uno o más parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados o causantes de una enfermedad o condición patológica. El seguimiento se considera un tipo de tratamiento siempre que los compuestos se administren en intervalos distintos, por ejemplo, para aumentar la respuesta y erradicar por completo los patógenos y/o los síntomas de la enfermedad. Se puede aplicar el compuesto idéntico o diferentes compuestos. Los métodos de la invención también pueden utilizarse para reducir la probabilidad de desarrollar un trastorno o incluso prevenir el inicio de trastornos asociados con una actividad TLR7/8 insuficiente o reducida (reducida en comparación con un sujeto sano) por adelantado o para tratar los síntomas emergentes y continuos.

[0278] En el sentido de la invención, el tratamiento profiláctico es aconsejable si el sujeto posee alguna condición previa para las condiciones fisiológicas o patológicas antes mencionadas, como una disposición familiar, un defecto genético o una enfermedad previamente incurrida.

[0279] Además, la invención se refiere en un aspecto adicional a un medicamento que comprende al menos un compuesto según la invención y/o derivados farmacéuticamente utilizables, sales, solvatos y estereoisómeros de los mismos, incluidas las mezclas de los mismos en todas las proporciones. En ciertas realizaciones, la invención se refiere a un medicamento que comprende al menos un compuesto de acuerdo con la invención y/o sales fisiológicamente aceptables del mismo.

[0280] En varias realizaciones, el ingrediente activo puede administrarse solo o en combinación con otros tratamientos. Se puede lograr un efecto sinérgico utilizando más de un compuesto en la composición farmacéutica, es decir, el compuesto de fórmula (I) o (II) puede combinarse con al menos otro agente como ingrediente activo, que puede ser otro compuesto de fórmula (I) o (II) o un compuesto de diferente andamiaje estructural. Los ingredientes activos se pueden utilizar de forma simultánea o secuencial.

[0281] En la bibliografía se demostró que el agonista del receptor tipo toll 7 (TLR7), R848, en combinación con radioterapia (RT), conduce a la eliminación prolongada del tumor en ratones portadores de linfoma de células T y B. Así, en un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar a un sujeto que sufre de linfoma mediante la administración de un compuesto de la invención en combinación con el tratamiento del sujeto con radioterapia.

[0282] Esta invención proporciona en un aspecto adicional un método para tratar el cáncer en un paciente que necesita dicho tratamiento que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la

invención y la administración de cantidades terapéuticamente efectivas de al menos un agente antineoplásico diferente seleccionado del grupo que consiste en: (1) un taxano, (2) un compuesto coordinador de platino, (3) un inhibidor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) que es un anticuerpo, (4) un inhibidor de EGF que es un compuesto de molécula pequeña, (5) un inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que es un anticuerpo, (6) un inhibidor de la quinasa VEGF que es un compuesto de molécula pequeña, (7) un antagonista del receptor de estrógeno o un modulador selectivo del receptor de estrógeno (MSRE), (8) un derivado de nucleósido antitumoral, (9) una epotilona, (10) un inhibidor de la topoisomerasa, (11) un alcaloide de vinca, (12) un anticuerpo que es un inhibidor de las integrinas $\alpha V\beta 3$; (13) un compuesto de molécula pequeña que inhibe las integrinas $\alpha V\beta 3$; (14) un antagonista del folato; (15) un inhibidor de la ribonucleótido reductasa; (16) una antraciclina; (17) un producto biológico anticancerígeno; (18) talidomida (o imida relacionada); y (19) Gleevec. En US20060183765 se dan ejemplos de estos compuestos antineoplásicos, incorporados aquí como referencia.

[0283] Un compuesto de la invención puede administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos, incluidos agentes anticancerígenos. Tal como se usa aquí, el término "agente anticancerígeno" se refiere a cualquier agente que se administra a un paciente con cáncer con el propósito de tratar el cáncer.

[0284] El tratamiento anticancerígeno puede aplicarse en monoterapia o puede implicar, además de los compuestos aquí divulgados de la invención, cirugía convencional o radioterapia o terapia medicinal. Dicha terapia farmacológica, por ejemplo, una quimioterapia o una terapia dirigida, puede incluir uno o más, pero preferiblemente uno, de los siguientes agentes antitumorales:

[0285] Agentes alquilantes: como altretamina, bendamustina, busulfán, carmustina, clorambucilo, clormetina, ciclofosfamida, dacarbazina, ifosfamida, improsulfán, tosilato, lomustina, melfalán, mitobronitol, mitolactol, nimustina,

ranimustina, temozolomida, tiotepa, treosulfán, mecloretamina, carbokona; apaziquona, fotemustina, glufosfamida, palifosfamida, pipobroman, trofosfamida, uramustina, TH-302, VAL-083;

[0286] Compuestos de platino: como carboplatino, cisplatino, eptaplatino, hidrato de miriplatino, oxaliplatino, lobaplatino, nedaplatino, picoplatino, satraplatino; loboplatino, nedaplatino, picoplatino, satraplatino;

[0287] agentes alteradores del ADN: como amrubicina, bisantreno, decitabina, mitoxantrona, procarbazona, trabectedina, clofarabina; amsacarina, brostallicina, pixantrona, laromustina;

[0288] Inhibidores de la topoisomerasa: como etopósido, irinotecán, razoxano, sobuzoxano, tenipósido, topotecán; amonafida, belotecan, acetato de eliptinio, voreloxina;

[0289] Modificadores de microtúbulos: como cabazitaxel, docetaxel, eribulina, ixabedulona, paclitaxel, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vindesina, vinflunina; fosbretabulina, tesetaxel; Antimetabolitos: como asparaginasa, azacitidina, levofolinato de calcio, capecitabina, cladribina, citarabina, enocitabina, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, mercaptopurina, metotrexato, nelarabina, pemetrexed, pralatrexato, azatioprina, tioguanina, carmofur; doxifluridina, elacitarabina, raltitrexed, sapacitabina, tegafur, trimetrexato;

[0290] Antibióticos anticancerígenos: como bleomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, levamisol, miltefosina, mitomicina C, romidepsina, estreptozocina, valrubicina, zinostatina, zorubicina, daunorubicina, plicamicina; aclarubicina, peplomycin, pirarubicina;

[0291] Hormonas/Antagonistas: como abarelix, abiraterona, bicalutamida, buserelina, calusterona, clorotrianiseno, degarelix, dexametasona, estradiol, fluocortolona, fluoximesterona, flutamida, fulvestrant, goserelina, histrelina, leuprorelina, megestrol, mitotano, nafarelina, nandrolona, nilutamida, octreotida,

prednisolona, raloxifeno, tamoxifeno, tiotropina alfa, toremifeno, trilostano, triptorelina, dietilestilbestrol; acolbifeno, danazol, deslorelina, epitiostanol, orteronel, enzalutamida;

[0292] Inhibidores de la aromatasa: como aminoglutetimida, anastrozol, exemestano, fadrozol, letrozol, testolactona; formestano;

[0293] Inhibidores de la quinasa de moléculas pequeñas: como crizotinib, dasatinib, erlotinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, pazopanib, regorafenib, ruxolitinib, sorafenib, sunitinib, vandetanib, vemurafenib, bosutinib, gefitinib, axitinib; afatinib, alisertib, dabrafenib, dacomitinib, dinaciclib, dovitinib, enzastaurin, nintedanib, lenvatinib, linifanib, linsitinib, masitinib, midostaurin, motesanib, neratinib, orantinib, perifosina, ponatinib, radotinib, rigosertib, tipifamib, tivantinib, tivozanib, trametinib, pimasertib, brivanib alaninato, cediranib, apatinib, cabozantinib S-malato, ibrutinib, icotinib, buparlisib, ciptatinib, cobimetinib, idelalisib, fedratinib, XL-647;

[0294] Fotosensibilizadores: como el metoxsaleno; porfímero sódico, talaporfina, temoporfina;

[0295] Anticuerpos: como alemtuzumab, besilesomab, brentuximab vedotina, cetuximab, denosumab, ipilimumab, ofatumumab, panitumumab, rituximab, tositumomab, trastuzumab, bevacizumab, pertuzumab; catumaxomab, elotuzumab, epratuzumab, farletuzumab, mogamulizumab, necitumumab, nimotuzumab, obinutuzumab, ocaratuzumab, oregovomab, ramucirumab, rilotumumab, siltuximab, tocilizumab, zalutumumab, zanolimumab, matuzumab, dalotuzumab, onartuzumab, racotumomab, tabalumab, abituzumab, nivolumab;

[0296] Citocinas: como aldesleucina, interferón alfa, interferón alfa2a, interferón alfa2b; celmoleukina, tasonermina, teceleucina, oprelvekin, interferón beta-1a recombinante;

[0297] Conjugados de fármacos: como denileukin diftotox, ibritumomab tiuxetan, iobenguane I123, prednimustina, trastuzumab emtansina, estramustina,

gemtuzumab, ozogamicina, aflibercept; cintredekin, besudotox, edotreotida, inotuzumab, ozogamicina, naptumamb, estafenatox, oportuzumab, monatox, tecnecio (99mTc), arcitumomab, vintafolida;

[0298] Vacunas: como sipuleucel; vitespe, emepepimut-S, oncoVAX, rindopepimut, troVax, MGN-1601, MGN-1703; y

[0299] Miscelánea: alitretinoína, bexaroteno, bortezomib, everolimus, ácido ibandronico, imiquimod, lenalidomida, lentinan, metirosina, mifamurtida, ácido pamidronico, pegaspargasa, pentostatina, sipuleucel, sizofiran, tamibaroteno, temsirolimus, talidomida, tretinoína, vismodegib, ácido zoledronico, vorinostat; celecoxib, cilengitida, entinostat, etanidazol, ganetespib, idronoxil, iniparib, ixazomib, lonidamina, nimorazol, panobinostat, peretinoína, plitidepsina, pomalidomida, procodazol, ridaforolimus, tasquinimod, telotristat, timalfasina, tirapazamina, tosedostat, trabedersen, ubenimex, valspodar, gendicine4 , picibanil4 , reolysin4 , clorhidrato de retaspimicina1, trebananib, virulizina, carfilzomib, endostatina, immucothel, belinostat, MGN-1703.

[0300] En consecuencia, los aspectos de la invención se relacionan con el tratamiento de un sujeto mediante la administración de un compuesto de la invención junto con uno o más de los aglutinantes antitumorales enumerados anteriormente en cantidades adecuadas para lograr un tratamiento de la enfermedad cancerosa en dicho sujeto.

[0301] En algunas realizaciones, la combinación de un inhibidor de TLR con uno o más agentes terapéuticos adicionales reduce la cantidad efectiva (incluyendo, pero no limitado a, el volumen de dosis, la concentración de dosis y/o la dosis total del fármaco administrada) del activador de TLR y/o de uno o más agentes terapéuticos adicionales administrados para lograr el mismo resultado en comparación con la cantidad efectiva administrada cuando el activador de TLR o el agente terapéutico adicional se administra solo.

[0302] Los activadores de TLR también pueden ser útiles como adyuvante de la vacuna para su uso junto con cualquier material que module la respuesta inmunitaria humoral y/o mediada por células, como, por ejemplo, inmunógenos virales vivos, bacterianos o parásitos; inmunógenos virales, derivados de tumores, protozoarios, derivados de organismos, fúngicos o bacterianos, toxoides, toxinas; antígenos propios; polisacáridos; proteínas; glicoproteínas; péptidos; vacunas celulares; Vacunas de ADN; proteínas recombinantes; glicoproteínas; péptidos; y cosas por el estilo. En algunos aspectos, la terapia combinada de la invención incluye, entre otros, la administración de una combinación de un compuesto de la invención y una vacuna. En algunos aspectos, la terapia combinada de la invención incluye, pero no se limita a, la combinación de un compuesto de la invención y una vacuna que se utiliza en el tratamiento de una enfermedad infecciosa.

[0303] Un aspecto adicional de la invención se refiere a un kit que comprende un compuesto de la invención tal como se proporciona en el presente documento, e instrucciones de uso en los métodos de activación de una respuesta inmune dependiente de TLR7 y/o TLR8.

[0304] El kit puede comprender uno o más recipientes que comprendan un compuesto de la invención (o una formulación que comprenda dicho compuesto) como se describe en este documento, y un conjunto de instrucciones, generalmente instrucciones escritas, aunque también son aceptables medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, disquete magnético o disco óptico) que contengan instrucciones, relacionadas con el uso y la dosificación del compuesto de la invención o formulación que comprende dicho compuesto para el tratamiento previsto (por ejemplo, activación de TLR7 y/o TLR8, tratando una infección viral, y/o tratando y/o previniendo uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno mediado por TLR7 y/o TLR8). Las instrucciones incluidas con el kit generalmente incluyen información sobre la dosis, el horario de dosificación y la vía de administración para el tratamiento

previsto. Los envases para el activador de TLR (o formulaciones que comprenden un activador de TLR) pueden ser dosis unitarias, paquetes a granel (por ejemplo, paquetes multidosis) o dosis subunitarias. Los kits pueden consistir además en un recipiente compuesto por un adyuvante.

[0305] En otro aspecto, la invención prevé un kit que consta de paquetes separados de una cantidad efectiva de un compuesto de acuerdo con la invención y/o sales, derivados, solvatos y estereoisómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos, incluyendo mezclas de los mismos en todas las proporciones, y opcionalmente, una cantidad efectiva de un ingrediente activo adicional. El kit se compone de recipientes adecuados, como cajas, botellas individuales, bolsas o ampollas. El kit puede, por ejemplo, contener ampollas separadas, cada una de las cuales contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito en este documento y/o derivados farmacéuticamente utilizables, solvatos y estereoisómeros de los mismos, incluidas las mezclas de los mismos en todas las proporciones, y una cantidad efectiva de un agente terapéutico adicional en forma disuelta o liofilizada.

[0306] Los compuestos de la invención se formulan preferiblemente en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma de unidad de dosificación", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente discreta de agente apropiada para el paciente que se va a tratar. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico tratante dentro del alcance de un juicio médico sano. El nivel de dosis efectiva específica para cualquier paciente u organismo en particular dependerá de una variedad de factores, incluido el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del

paciente; el momento de la administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; drogas utilizadas en combinación o coincidencia con el compuesto específico empleado, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

[0307] Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención pueden administrarse a humanos y otros animales por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como polvos, ungüentos o gotas), bucal, como aerosol oral o nasal, o similar, dependiendo de la gravedad de la infección que se está tratando. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención se administran por vía oral o parenteral a niveles de dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg y preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado. En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención y fórmulas relacionadas y del otro ingrediente activo puede depender de una serie de factores, incluyendo, por ejemplo, la edad y el peso del animal, la condición precisa de la enfermedad que requiere tratamiento, y su gravedad, la naturaleza de la formulación y el método de administración, y, en última instancia, lo determina el médico o veterinario tratante. Sin embargo, una cantidad efectiva de un compuesto suele oscilar entre 0,1 y 100 mg/kg de peso corporal del receptor (mamífero) al día y, en particular, suele oscilar entre 1 y 10 mg/kg de peso corporal al día. Así, la cantidad real al día para un mamífero adulto que pesa 70 kg suele estar entre 70 y 700 mg, donde esta cantidad puede administrarse como una dosis individual al día o normalmente en una serie de dosis parciales (como, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis) al día, de modo que la dosis diaria total sea la misma. Una cantidad efectiva de una sal o solvato o de un derivado fisiológicamente funcional de los mismos puede determinarse como la fracción de la cantidad efectiva del compuesto per se.

[0308] En ciertas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse en forma de unidades de dosificación, que comprenden una cantidad predeterminada de ingrediente activo por unidad de dosificación. Dicha unidad puede comprender, por ejemplo, de 0,5 mg a 1 g, preferiblemente de 1 mg a 700 mg, particularmente preferiblemente de 5 mg a 100 mg, de un compuesto según la invención, dependiendo de la enfermedad tratada, el método de administración y la edad, peso y condición del paciente, o las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse en forma de unidades de dosificación que comprenden una cantidad predeterminada de ingrediente activo por unidad de dosificación. Las formulaciones unitarias de dosificación preferidas son aquellas que comprenden una dosis diaria o una dosis parcial, como se indicó anteriormente, o una fracción correspondiente de la misma de un ingrediente activo. Además, las formulaciones farmacéuticas de este tipo se pueden preparar mediante un proceso, que es generalmente conocido en el arte farmacéutico.

[0309] Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral de un compuesto de la invención incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas farmacéuticas líquidas contienen opcionalmente diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, semilla de algodón, cacahuete, aceites de maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes como agentes humectantes, agentes emulsionantes y suspendientes, edulcorantes, aromatizantes y

agentes perfumantes.

[0310] Las preparaciones inyectables, por ejemplo, las suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable estéril o una suspensión en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable por vía parenteral, por ejemplo, en forma de solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el agua, la solución de Ringer, U.S. P. y solución isotónica de cloruro sódico. Además, los aceites estériles y fijos pueden emplearse convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluidos los monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico se pueden utilizar en la preparación de inyectables.

[0311] Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro retenedor de bacterias, o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

[0312] Con el fin de prolongar el efecto de un compuesto de la presente invención, a menudo es deseable ralentizar la absorción del compuesto de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. La tasa de absorción del compuesto depende entonces de su tasa de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma compuesta administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el compuesto en un vehículo de petróleo. Las formas de depósito inyectables se pueden fabricar formando matrices

microencapsuladas del compuesto en polímeros biodegradables como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la proporción de compuesto a polímero y de la naturaleza del polímero en particular empleado, se puede controlar la tasa de liberación del compuesto. Algunos ejemplos de otros polímeros biodegradables son los poli(ortoésteres) y los poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el compuesto en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

[0313] Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos de esta invención con excipientes o portadores adecuados no irritantes como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.

[0314] Las formas farmacéuticas sólidas para la administración oral de un compuesto de la invención incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas farmacéuticas sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o portador inerte y farmacéuticamente aceptable, como el citrato de sodio o el fosfato dicálcico y/o a) rellenos o diluyentes como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidinona, sacarosa y acacia, c) humectantes como el glicerol, d) agentes desintegrantes como agaragar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio, e) agentes retardantes de solución como la parafina, f) aceleradores de absorción como los compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes como, por ejemplo, el alcohol cetílico y el monoestearato de glicerol, h) absorbentes como el caolín y la arcilla de bentonita, e i) lubricantes como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de

los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma farmacéutica también incluye opcionalmente agentes tampón.

[0315] Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como rellenos en cápsulas de gelatina blandas y duras, utilizando excipientes como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas farmacéuticas sólidas de tabletas, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cáscaras como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en el arte de la formulación farmacéutica. Opcionalmente contienen agentes opacificantes y también pueden ser de una composición que liberen el (los) principio (s) activo (s) solamente, o preferentemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Algunos ejemplos de composiciones de inclusión que se pueden utilizar son las sustancias poliméricas y las ceras. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se emplean como rellenos en cápsulas de gelatina blandas y duras, utilizando excipientes como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

[0316] Los compuestos de la invención también pueden formularse en forma microencapsulada con uno o más excipientes como se ha señalado anteriormente. Las formas farmacéuticas sólidas de tabletas, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cáscaras como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de liberación y otros recubrimientos bien conocidos en el arte de la formulación farmacéutica. En tales formas farmacéuticas sólidas, el compuesto activo de la invención puede mezclarse con al menos un diluyente inerte como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas farmacéuticas también pueden incluir, como es práctica habitual, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes para tabletas y otros coadyuvantes para tabletas como el estearato de magnesio y la celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas,

comprimidos y píldoras, las formas farmacéuticas también incluyen opcionalmente agentes tampón. Opcionalmente contienen agentes opacificantes y también pueden ser de una composición que liberen el (los) principio (s) activo (s) solamente, o preferentemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Algunos ejemplos de composiciones de inclusión que se pueden utilizar son las sustancias poliméricas y las ceras.

[0317] Las formas farmacéuticas para la administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluyen ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, aerosoles, inhalantes o parches. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario, según sea necesario. La formulación oftálmica, las gotas para los oídos y las gotas para los ojos también se contemplan dentro del alcance de esta invención. Además, la presente invención contempla en realizaciones preferidas el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja añadida de proporcionar la entrega controlada de un compuesto al cuerpo. Tales formas farmacéuticas se pueden hacer disolviendo o dispensando el compuesto en el medio adecuado. Los potenciadores de la absorción también se pueden utilizar para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La tasa se puede controlar proporcionando una membrana que controle la velocidad o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.

[0318] De acuerdo con una realización, la invención se refiere a un método de activación de la actividad de TLR7/8 en una muestra biológica que comprende el paso de contactar dicha muestra biológica con un compuesto de esta invención, o una composición que comprende dicho compuesto. De acuerdo con otra realización, la invención se refiere a un método de activación de la actividad de TLR7/8, o un mutante del mismo, en una muestra biológica, que comprende el paso de contacto de dicha muestra biológica con un compuesto de esta invención, o una composición que

comprende dicho compuesto.

[0319] Los compuestos de la invención son útiles in vitro como herramientas únicas para comprender el papel biológico de TLR7/8, incluida la evaluación de los muchos factores que se cree que influyen y son influenciados por la producción de TLR7/8 y la interacción de TLR7/8. Los compuestos presentes también son útiles en el desarrollo de otros compuestos que interactúan con TLR7/8, ya que los compuestos actuales proporcionan información importante sobre la relación estructura-actividad (SAR) que facilita ese desarrollo. Los compuestos de la presente invención que se unen a TLR7/8 pueden utilizarse preferentemente como reactivos para la detección de TLR7/8 en células vivas, células fijas, en fluidos biológicos, en homogeneizados de tejidos, en materiales biológicos naturales purificados, etc. Por ejemplo, mediante el etiquetado detectable de los compuestos de la invención, se pueden identificar las células que expresan TLR7/8. Además, en base a su capacidad para unirse a TLR7/8, los compuestos de la presente invención se pueden utilizar en tinción in situ, FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia), electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), etc., purificación de enzimas, o en la purificación de células que expresan TLR7/8 dentro de células permeabilizadas. Los compuestos de la invención también pueden utilizarse como reactivos de investigación comercial para diversos usos de investigación médica y diagnóstico. Dichos usos pueden incluir, entre otros: uso como estándar de calibración para cuantificar las actividades de los activadores candidatos a TLR7/8 en una variedad de ensayos funcionales; uso como reactivos activadores en el cribado de compuestos aleatorios, es decir, en la búsqueda de nuevas familias de ligandos TLR7/8; uso en la cocrystalización con TLR7/8, es decir, los compuestos de la presente invención permitirán la formación de cristales del compuesto unidos a TLR7/8, permitiendo la determinación de la estructura de la enzima/compuesto mediante cristalografía de rayos X; otras aplicaciones de

investigación y diagnóstico, en las que se activa preferentemente TLR7/8 o dicha activación se calibra convenientemente con una cantidad conocida de un activador TLR7/8, etc.; uso en ensayos como sondas para determinar la expresión de TLR7/8 en células; y el desarrollo de ensayos para la detección de compuestos que se unen al mismo sitio que los ligandos de unión a TLR7/8. Los compuestos de la invención pueden aplicarse solos y/o en combinación con mediciones físicas para el diagnóstico de la eficacia del tratamiento. Las composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos y el uso de dichos compuestos para tratar afecciones mediadas por TLR7/8 es un enfoque prometedor y novedoso para un amplio espectro de terapias que causan una mejora directa e inmediata en el estado de salud, ya sea en humanos o en animales. Las nuevas entidades químicas biodisponibles y activas por vía oral de la invención mejoran la comodidad para los pacientes y el cumplimiento para los médicos.

[0320] Los compuestos de la invención, sus sales, isómeros, tautómeros, formas enantioméricas, diastereómeros, racematos, derivados, profármacos y/o metabolitos se caracterizan por una alta especificidad y estabilidad, bajos costes de fabricación y cómodo manejo. Estas características forman la base para una acción reproducible, en la que se incluye la falta de reactividad cruzada, y para una interacción fiable y segura con la estructura objetivo.

[0321] Una muestra biológica puede referirse a, sin limitación, cultivos celulares o extractos de los mismos; material de biopsia obtenido de un mamífero o extractos de éste; y sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas u otros fluidos corporales o extractos de los mismos.

[0322] La modulación de la actividad de TLR7/8, o un mutante de la misma, en una muestra biológica es útil para una variedad de propósitos que son conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de tales propósitos incluyen, pero no se limitan a, transfusiones de sangre, trasplante de órganos, almacenamiento de muestras

biológicas y ensayos biológicos.

OTROS USOS

[0323] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención aquí descrito y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente quimioterapéutico. En un aspecto, la presente invención proporciona un método para estimular una respuesta inmune en un sujeto. El método incluye la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención aquí descrita en condiciones eficaces para estimular una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, el método se realiza en un sujeto que tiene cáncer. En otras realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer gástrico, cáncer testicular, cáncer biliar, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de cabeza/cuello, cáncer medular de tiroides, cáncer renal, cáncer de ojo, neuroblastoma, micosis fungoide, tumor glial, otro tumor cerebral, tumor de la médula espinal, cáncer de hígado, leucemia, linfoma y cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, un compuesto de la invención puede estar comprendido en una composición farmacéutica líquida. La composición líquida de la invención puede administrarse en un tumor (por ejemplo, administración intratumoral (IT)) para inducir preferiblemente una respuesta inmunitaria innata y una respuesta inmunitaria mediada por células contra los antígenos tumorales (por ejemplo, reducir o estabilizar el tumor). En una realización adicional, un compuesto de la invención se conjuga con un péptido. El conjugado que comprende un péptido no es necesariamente un antígeno o inmunógeno, sino un mecanismo para reducir la solubilidad del agonista

TLR7 y/o TLR8 creando un depósito que se retiene en el sitio de administración, como dentro de un tumor o en el microambiente tumoral. Un agonista conjugado de TLR7 y/o TLR8 de la invención puede estimular células inmunosupresoras y puede inducir la respuesta inmune contra los antígenos presentes en el tumor. Además, la movilización de las células inmunosupresoras puede inducir una respuesta inmunitaria no solo contra el tumor en el lugar de administración, sino también contra tumores periféricos, cercanos y/o distantes. En una realización, se proporcionan métodos para estimular una respuesta inmune antitumoral en un sujeto, donde los métodos comprenden la administración intratumoral o peritumoral de una forma líquida de la composición farmacéutica de la invención en el sujeto, donde la respuesta inmune antitumoral será preferiblemente efectiva en un sitio distante del sitio de administración de la composición farmacéutica. La presente invención también proporciona, en un aspecto adicional, un método para inducir una respuesta inmune antitumoral en un sujeto. El método incluye la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención descrito en este documento en condiciones eficaces para inducir una respuesta inmunitaria antitumoral. En algunas realizaciones, el método se realiza en un sujeto seleccionado que tiene un tumor. En algunas realizaciones, el tumor se selecciona del grupo que consiste en fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, glándula sebácea carcinoma, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor

de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma. La presente invención proporciona, en un aspecto adicional, un método para tratar un tumor o una proliferación celular anormal en un sujeto. El método incluye la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención descrita en este documento en condiciones eficaces para tratar un tumor o una proliferación celular anormal. En algunas realizaciones, el tumor o la proliferación celular anormal es cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer gástrico, cáncer testicular, cáncer biliar, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de cabeza y cuello, cáncer medular de tiroides, cáncer renal, cáncer de ojo, neuroblastoma, micosis fungoide, tumor glial, otro tumor cerebral, tumor de la médula espinal, cáncer de hígado, leucemia, linfoma y cualquier combinación de los mismos. La presente invención proporciona además, en otro aspecto, un método para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto. El método incluye la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención descrita en el presente documento en condiciones eficaces para tratar una enfermedad infecciosa. En algunas realizaciones, la enfermedad infecciosa es una infección viral, una infección bacteriana, una infección fúngica o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la enfermedad infecciosa es una infección viral, y la enfermedad infecciosa se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un coronavirus (incluidos, entre otros, el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS), SARS-CoV-2 (COVID-19), Síndrome Respiratorio de Oriente Medio

(MERS) y el resfriado común), Ébola, gripe, hepatitis, enfermedad por Hib, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma humano (VPH), enfermedad meningocócica, enfermedad neumocócica, sarampión, paperas, norovirus, poliomielitis, virus respiratorio sincitial (VRS), rotavirus, virus de la rubéola, herpes zóster, virus del Nilo Occidental, virus de la rabia, enterovirus, citomegalovirus, virus del herpes, varicela, fiebre amarilla, virus del Zika y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la enfermedad infecciosa es una infección bacteriana, y la enfermedad infecciosa se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en enfermedad estreptocócica, enfermedad estafilocócica, difteria, enfermedad meningocócica, tétanos, tos ferina, enfermedad neumocócica, intoxicación alimentaria bacteriana, una infección de transmisión sexual, tuberculosis, enfermedad de Lyme, botulismo o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la enfermedad infecciosa es una infección fúngica, y la enfermedad infecciosa es candidiasis, histoplasmosis, dermatofitosis, tiña del pie, aspergilosis, meningitis criptocócica, coccidioidomicosis y cualquier combinación de las mismas.

COMPOSICIONES TÓPICAS, INTRAQUÍSTICAS E INTRATUMORALES QUE COMPRENDEN UN COMPUESTO DE LA INVENCION PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES

[0324] Un compuesto de la invención puede formularse junto con otros compuestos, como un potenciador químico de la penetración. Los potenciadores de la penetración química se utilizan a menudo en formulaciones tópicas y transdérmicas para mejorar la absorción, la absorción y la entrega de ingredientes farmacéuticos activos (fármacos o sustancias farmacológicas) en la piel. Tales formulaciones que comprenden un compuesto de la invención pueden ser útiles, por ejemplo, para tratar el cáncer de piel. También se pueden emplear formulaciones adecuadas para complementar una mayor permeabilidad dentro de un compartimento localizado del tejido y/o para mejorar una respuesta relacionada con el sistema inmunitario en el

tejido en el que se administran. Para mejorar la permeabilidad y absorción del compuesto de la invención en la piel/tumor, la formulación puede comprender, pero no se limita a, una combinación de uno o más potenciadores químicos; uno o más solventes o vehículos que mejoran la porción del fármaco y potenciadores químicos en la piel o el tumor; y un agente gelificante o matriz para su incorporación como formulación tópica o intratumoral. Varios ejemplos de productos químicos bajo cada categoría han sido descritos previamente en la literatura. Sin embargo, la combinación específica en la que se emplea cada ingrediente para que coincida con las propiedades fisicoquímicas del medicamento y mejore su penetración en la piel no es trivial ni depende singularmente de las propiedades específicas de los productos químicos individuales. Es importante tener en cuenta que el efecto de cada ingrediente sobre la piel/tumor depende de la concentración empleada en la formulación y se pueden esperar efectos sinérgicos de su combinación en una sola formulación. Estos efectos pueden ser aditivos, positivamente sinérgicos o negativamente sinérgicos. Esto implica que la cinética de la penetración en la piel/tumor y los efectos acumulativos del fármaco administrado en la piel/tumor y a través de la piel/tumor a partir de estas formulaciones dependen de la formulación específica empleada. Por lo tanto, se deduce que los criterios de valoración fisiológicos, biológicos y terapéuticos del fármaco están determinados en gran medida por la formulación, además de por las propiedades del fármaco. Estos criterios de valoración incluyen, entre otros, la farmacocinética/farmacodinamia (PK/PD), la absorción acumulativa determinada por el área bajo la curva (AUC), la bioequivalencia, el índice terapéutico (TI), por destacar algunos. Además, la formulación específica del medicamento afecta no solo su potencia, sino también la tolerancia / seguridad en la piel en la aplicación. Esto puede incluir, entre otros, efectos adversos como irritación, toxicidad de la piel, eritema, entre otros.

[0325] Un efecto beneficioso de los potenciadores químicos de la

permeación, además de mejorar la permeabilidad de un compuesto de la invención a través de un tejido, o dentro de un compartimento de tejido localizado como un tumor, es proporcionar un efecto inflamatorio que influye en la dirección de la respuesta inmunitaria importante, por ejemplo, en la terapia tumoral. Por lo tanto, la incorporación de agentes en formulaciones tópicas, intraquísticas y/o inyectables puede lograr efectos aditivos o más que aditivos hacia el objetivo terapéutico del tratamiento tumoral.

[0326] Las formulaciones que son adecuadas para la administración incluyen cremas, ungüentos, soluciones, geles, lociones, pastas, parches, espumas o formulaciones en aerosol que contienen los portadores que se sabe que son apropiados en la técnica. Formas farmacéuticas para la administración tópica, intraquística o intratumoral de un compuesto de la invención y, opcionalmente, otros agentes incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, ungüentos, lociones, geles, soluciones y parches. El componente activo puede mezclarse en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o propulsor que pueda ser necesario. Los ungüentos, pastas, cremas, lociones, soluciones, espumas y geles pueden contener, además de un agente terapéutico, excipientes, como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de la celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos. Las formulaciones inyectables que comprenden un compuesto de la invención también pueden lograrse mediante el uso de aceites purificados (aceite de soja, aceite de cártamo, trioleína y aceite de ricino, aceite de coco fraccionado, miglyol810, 812, Neobee MS, Captex 300) y rellenos dérmicos aprobados por la FDA (hidroxiapatita, ácido hialurónico, ácido poli-L-láctico, colágeno, hidrogel) como componentes de la formulación inyectable. Se pueden diseñar formulaciones tópicas, intraquísticas e intratumorales que comprendan un compuesto de la invención que se optimicen seleccionando los

ingredientes específicos de la formulación, incluyendo el potenciador, el vehículo y la matriz (Karande 2004 Nature Biotechnology, Karande 2005 PNAS, y referencias relacionadas dentro y citando estos trabajos). Una formulación específica puede tener un profundo efecto en la eficacia del fármaco y en la indicación objetivo. Las propiedades fisicoquímicas de un compuesto activo se pueden derivar de su estructura y composición química. Se pueden estimar descriptores químicos para los potenciadores de permeación que permiten equilibrar su potencia y seguridad. Sobre la base de esto, se pueden identificar combinaciones de potenciadores de permeación química que contienen productos químicos de la lista a continuación en el rango de concentración total de 0-2% wt/vol en fracciones de peso que oscilan entre 0 y 100%. La formulación puede contener 2 o 3 productos químicos individuales en un solvente para hacer la formulación.

[0327] Un compuesto de la invención puede combinarse en una formulación que comprenda uno o más de los siguientes aditivos: Octil sulfato de sodio, Decil sulfato de sodio, Dodecil sulfato de sodio, Tetradecil sulfato de sodio, Heptadecil sulfato de sodio, Eicosilsulfato de sodio, Lauret sulfato de sodio, Sulfato de nicotina, Sulfato de taurocólico de sodio, Dimetilsulfóxido, Tridecil fosfato de sodio, ChemBetaine CAS, ChemBetaine Oleyl, ChemBetaine C, Hexadecildimetil amónico sulfonato de propano, Decyldimethyl ammonio propionato sulfonato, Dodecildimetil amonio sulfonato de propano, Bencílico cloruro de piridinio, cloruro de dodecil piridinio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de bencildimetil dodecil amonio, cloruro de bencildimetil miristil amonio, cloruro de bencildimetil estearilo de amonio bromuro de octiltrimetil amonio, bromuro de deciltrimetil amonio, dodeciltrimetil amonio, cloruro de miristiltrimetil amonio, bromuro de cetiltrimetil amonio monolaurato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, monooleato de sorbitán Polioxietileno sorbitán monolaurato, monopalmitato de sorbitán de polioxietileno, Brij 97 Brij 30, Brij 56, Tritón

X-100, Ácido hexanoico, Ácido octanoico, Ácido decanoico, Ácido undecanoico, Ácido dodecanoico, Ácido tridecanoico, Ácido mirístico, Ácido palmítico, Ácido esteárico, Ácido oleico, Ácido elaídico, Ácido linoleico, Ácido linolénico, Ácido cólico, Hexanoato de metilo, Undecanoato de etilo, Laurato de metilo, Tridecanoato de metilo, Miristato de metilo, Miristato de isopropilo, Palmitato de palmitilo, Sebaccato de dietilo, Tetracaína, Monolaurato de glicerilo, Monooleato de glicerilo, Carboxilato de etilpiperazina, N-Lauril sarcosinato, Caprilato de sodio, Decanoato de sodio, Palmitato de sodio, Oleato de sodio, Octil amina, Decil amina, Dodecil amina, Tetradecil amina, Oleil amina, Urea, Metil pirrolidona, Ciclohexilo pirrolidona, Octil pirrolidona, Decil pirrolidona, Decil metilpirrolidona, Metilpiperazina, Fenilpiperazina, Octanamida, Hexadecanamida, Caprolactama, Carveol, Óxido de pineno, Limoneno, Mentol, Pulegona, Carvacrol, Pineno, Menthona, Terpeneol, Cineol, Fenchona, Triacetina, Trimetoxi propileno metilbenceno, Linalol, Geraniol y Octil dodecanol. Otros incluyen sulfóxidos, alcoholes, polioles, alcanos, ácidos grasos, ésteres, aminas y amidas, terpenos, agentes tensioactivos, ciclodextrinas, alcoholes C2 o C3 y superiores, un diol C3 o C4 o superior, DMSO, DMF, DMA y disolventes relacionados, 1-n-dodecil-ciclazacicloheptano-2-ona, N-metil-pirrolidona y N-(2-hidroxietil)pirrolidona, y una clase más amplia de azones, y mezclas (binarias, ternarias o superiores)

[0328] Un compuesto de la invención puede formularse con potenciadores químicos que pueden mejorar el transporte del compuesto. Los potenciadores químicos opcionales incluyen hidrocarburos de cadena larga con un grupo de cabeza polar, como tensioactivos, ácidos grasos y ésteres grasos.

[0329] La insaturación (simple o doble) en la cadena de hidrocarburos puede ayudar adicionalmente a la fluidización de las bicapas lipídicas de la piel y a la permeación de un compuesto de la invención. El ácido oleico, el ácido linoleico, el ácido linolénico, el ácido palmítico, el ácido mirístico, etc. son ejemplos de ácidos grasos. Los ésteres de ácidos grasos como el palmitato, el miristato, el oleato, el

linoleato, etc. con un pequeño grupo alquilo como el metilo, el etilo, el propilo o el butilo son ejemplos de ésteres grasos. Las sales de ésteres grasos como el lauril sulfato de sodio, el oleato de sodio, etc., son ejemplos de tensioactivos. Los alcoholes de cadena corta, como el etanol, el isopropanol, el butanol, el hexanol, etc., son ejemplos de disolventes. Las combinaciones de productos químicos y disolventes pueden mejorar significativamente la permeabilidad de un compuesto de la invención a través de la piel si el compuesto de la invención está formulado como formulación tópica. Las combinaciones de tales ejemplares son formulaciones viables con potencia y seguridad variables con perfiles PK/PD variables para el API que es un compuesto de la invención.

[0330] A continuación se muestran algunos ejemplos de formulaciones que incorporan los productos químicos mencionados anteriormente y sus combinaciones: Un compuesto de la invención en una concentración de 0,01, ,02, ,03, ,04 a 1 wt/vol%, en el que el compuesto se combina preferiblemente con uno o más y preferiblemente todos los componentes enumerados en i, ii, iii, iv, v, vi, vii, viii, ix, x, xi, xii o xiii a continuación:

[0331] i. Ácido oleico (50%) y miristato de isopropilo (50%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 1% en peso/vol.

[0332] ii. Miristato de isopropilo (50%) y lauril sulfato de sodio (50%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 0,5% en peso/vol.

[0333] iii. Ácido oleico (50%) y lauril sulfato de sodio (50%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 0,5% en peso/vol.

[0334] Iv. Ácido oleico (33%), miristato de isopropilo (33%) y lauril sulfato de sodio (33%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con

fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 0,5% en peso/vol.

[0335] v. Palmitato de isopropilo (50%) y oleato de sodio (50%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 2% en peso/vol.

[0336] vi. Lauril sulfato de sodio (25%) y ácido linoleico (75%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 1,0% en peso/vol.

[0337] vii. Ácido palmítico (50%) y laurato de isopropilo (50%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 2,0% peso/vol.

[0338] viii. Ácido oleico (50%) y ácido linoleico (50%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 1,5% en peso/vol.

[0339] ix. Ácido linoleico (25%), ácido oleico (25%) y linoleato de isopropilo (50%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 0,5% en peso/vol.

[0340] x. Oleato de sodio (33%), ácido oleico (33%) y palmitato de metilo (33%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol a una concentración total de 2,0% en peso/vol.

[0341] xi. Una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol.

[0342] xii. Ácido oleico (10%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol.

[0343] xiii. Ácido oleico (2%) y lauril sulfato de sodio (5%) en una solución que contiene 50 ml de solución salina tamponada con fosfato y 50 ml de etanol.

MEDICAMENTOS Y USOS ULTERIORES DE LOS COMPONENTES Y COMPOSICIONES DE LA INVENCION

[0344] Como se mencionó, los aspectos de la presente invención incluyen la provisión de composiciones de acuerdo con la invención para su uso como medicamento.

[0345] El régimen de dosificación será determinado por el médico tratante y los factores clínicos. Como es bien sabido en las artes médicas, la dosis para cualquier paciente depende de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el peso, el área de la superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, la actividad del compuesto empleado, el tiempo y la vía de administración, la salud general y la combinación con otras terapias o tratamientos. La materia farmacéuticamente activa proteica puede estar presente en cantidades comprendidas entre 1 g y 100 mg/kg de peso corporal por dosis; sin embargo, también se prevén dosis por debajo o por encima de este rango ejemplar. Si el régimen es una infusión continua, puede estar en el rango de 1 pg a 100 mg por kilogramo de peso corporal por minuto.

[0346] Las cantidades o dosis específicas que se administrarán pueden ser determinadas por el médico, nuevamente en función de los factores citados anteriormente. Las dosis útiles de los compuestos de la invención pueden determinarse comparando su actividad *in vitro* y su actividad *in vivo* en modelos animales. Los métodos para la extrapolación de dosis efectivas en ratones y otros animales a los humanos son conocidos por el arte; véase, por ejemplo, US 4.938.949.

[0347] Generalmente, dependiendo de la enfermedad, trastorno o condición específica que se vaya a tratar, de la potencia del compuesto específico de la invención, de la vía de administración específica y de la formulación o composición farmacéutica específica utilizada, el clínico podrá determinar una dosis adecuada.

[0348] La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una sola dosis o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis por día. La subdosis en sí puede dividirse a su

vez, *e.g.*, en una serie de administraciones discretas poco espaciadas. Preferiblemente, la dosis se administra una vez por semana o incluso con menos frecuencia, como una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes o incluso una vez cada dos meses.

[0349] Un régimen de administración podría incluir un tratamiento a largo plazo. Por "largo plazo" se entiende al menos dos semanas y, preferiblemente, varias semanas, meses o años de duración. Las modificaciones necesarias en este rango de dosis pueden ser determinadas por alguien de habilidad ordinaria en el arte utilizando solo la experimentación de rutina dadas las enseñanzas aquí expuestas. Véase Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA. La dosis también puede ser ajustada por el médico individual en caso de cualquier complicación.

[0350] Por lo general, en el método anterior, se utilizará un compuesto de la invención. Sin embargo, está dentro del alcance de la invención utilizar dos o más compuestos diferentes de la invención en combinación o un compuesto de la invención en combinación con un medicamento adicional.

[0351] Una vez más, el clínico podrá seleccionar dichos compuestos o medicamentos adicionales, así como un régimen de tratamiento combinado adecuado, en función de los factores citados anteriormente y de su juicio experto.

[0352] Cuando dos o más sustancias o principios van a utilizarse como parte de un régimen de tratamiento combinado, pueden administrarse por la misma vía de administración o por diferentes vías de administración, esencialmente al mismo tiempo o en diferentes momentos (por ejemplo, esencialmente de forma simultánea, consecutiva o según un régimen alterno). Cuando las sustancias o principios deban administrarse simultáneamente por la misma vía de administración, podrán administrarse como formulaciones o composiciones farmacéuticas diferentes o como parte de una formulación o composición farmacéutica combinada, según quede claro

para la persona experta.

[0353] Además, cuando se vayan a utilizar dos o más sustancias o principios activos como parte de un régimen de tratamiento combinado, cada una de las sustancias o principios podrá administrarse en la misma cantidad y con arreglo al mismo régimen que se utilizó cuando el compuesto o principio se utiliza por sí solo, y dicho uso combinado puede o no dar lugar a un efecto sinérgico. Sin embargo, cuando el uso combinado de dos o más sustancias activas o principios conduce a un efecto sinérgico, también puede ser posible reducir la cantidad de una, más o todas las sustancias o principios que se administran, sin dejar de lograr la acción terapéutica deseada. Esto puede ser útil, por ejemplo, para evitar, limitar o reducir cualquier efecto secundario no deseado asociado con el uso de una o más de las sustancias o principios cuando se usan en sus cantidades habituales, sin dejar de obtener el efecto farmacéutico o terapéutico deseado.

[0354] La efectividad del régimen de tratamiento utilizado de acuerdo con la divulgación puede determinarse y/o seguirse de cualquier manera conocida per se para la enfermedad, trastorno o afección en cuestión, según quede claro para el médico. El clínico también podrá, cuando proceda y caso por caso, cambiar o modificar una pauta de tratamiento concreta, con el fin de lograr el efecto terapéutico deseado, evitar, limitar o reducir los efectos secundarios no deseados y/o lograr un equilibrio adecuado entre lograr el efecto terapéutico deseado, por una parte, y evitar, limitar o reducir los efectos secundarios no deseados, por otra.

[0355] Generalmente, se seguirá el régimen de tratamiento hasta que se logre el efecto terapéutico deseado y/o durante el tiempo que se mantenga el efecto terapéutico deseado. Una vez más, esto puede ser determinado por el clínico.

[0356] Así, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos un compuesto de la invención y al menos un portador, diluyente o excipiente adecuado (es decir, adecuado para uso farmacéutico),

y opcionalmente una o más sustancias activas adicionales. En un aspecto particular, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención (preferiblemente al menos un compuesto seleccionado de los ejemplos 1 a 27 mostrados en las reivindicaciones y más preferiblemente un compuesto seleccionado de los ejemplos 1 a 6 de la lista mostrada en las reivindicaciones) y al menos un portador adecuado, diluyente o excipiente (es decir, apto para uso farmacéutico) y, opcionalmente, uno o más principios activos adicionales.

[0357] El sujeto a tratar puede ser cualquier animal de sangre caliente, pero es en particular un mamífero, y más en particular un ser humano. En las aplicaciones veterinarias, el sujeto a tratar incluye cualquier animal criado con fines comerciales o mantenido como mascota. Como quedará claro para la persona experta, el sujeto a tratar será, en particular, una persona que padezca o corra el riesgo de padecer las enfermedades, trastornos y afecciones mencionados en este documento. Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención son para uso en medicina o diagnóstico. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas son para uso en medicina humana, pero también pueden usarse con fines veterinarios.

[0358] De nuevo, en una composición farmacéutica de este tipo, uno o más compuestos de la invención también pueden combinarse adecuadamente con uno o más principios activos, como los mencionados en el presente documento.

[0359] La invención también se refiere a una composición farmacéutica para su uso, ya sea *in vitro* (por ejemplo, en un ensayo *in vitro* o celular) o *in vivo* (por ejemplo, en una sola célula u organismo pluricelular, y en particular en un mamífero, y más en particular en un ser humano, como en un ser humano que corre el riesgo de padecer o padece una enfermedad, desorden o condición de la invención).

[0360] Debe entenderse que la referencia al tratamiento incluye tanto el

tratamiento de los síntomas establecidos como el tratamiento profiláctico, a menos que se indique explícitamente lo contrario.

[0361] Generalmente, para uso farmacéutico, los compuestos de la invención pueden formularse como una preparación o composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto utilizado en la invención y al menos un portador, diluyente o excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos. Por medio de ejemplos no limitativos, dicha formulación puede estar en una forma adecuada para la administración oral, para la administración parenteral (como por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea o infusión intravenosa), para la administración tópica (como la administración intraarticular), para la administración por inhalación, por un parche cutáneo, por un implante, por un supositorio, etc., en los que se prefiere la administración intraarticular. Dichos formularios de administración adecuados, que pueden ser sólidos, semisólidos o líquidos, dependiendo de la forma de administración, así como los métodos y soportes para su uso en la preparación de los mismos, serán claros para la persona experta y se describen con más detalle en el presente documento. Dicha preparación o composición farmacéutica se denominará generalmente en el presente documento "composición farmacéutica".

[0362] Como ejemplos de excipientes, se pueden mencionar los desintegradores, aglutinantes, rellenos y lubricantes. Algunos ejemplos de desintegradores son el agar-agar, las alginas, el carbonato de calcio, la celulosa, el dióxido de silicio coloidal, las gomas, el silicato de magnesio y aluminio, la metilcelulosa y el almidón. Algunos ejemplos de aglutinantes son la celulosa microcristalina, la hidroximetilcelulosa, la hidroxipropilcelulosa y la polivinilpirrolidona. Algunos ejemplos de rellenos son el carbonato de calcio, el fosfato de calcio, el sulfato de calcio tribásico, la carboximetilcelulosa de calcio, la celulosa, la dextrina, la dextrosa, la fructosa, el lactitol, la lactosa, el carbonato de magnesio, el óxido de

magnesio, el maltitol, las maltodextrinas, la maltosa, el sorbitol, el almidón, la sacarosa, el azúcar y el xilitol. Algunos ejemplos de lubricantes son el agar, el oleato de etilo, el laureado de etilo, la glicerina, el palmitostearato de glicerilo, el aceite vegetal hidrogenado, el óxido de magnesio, los estearatos, el manitol, el poloxámero, los glicoles, el benzoato de sodio, el lauril sulfato de sodio, el estearilo de sodio, el sorbitol y el talco. Los estabilizantes, conservantes, agentes humectantes y emulsionantes, agentes que mejoran la consistencia, agentes que mejoran el sabor, sales para variar la presión osmótica, sustancias tampón, solubilizantes, diluyentes, emolientes, colorantes y agentes enmascarantes y antioxidantes se consideran como adyuvantes farmacéuticos.

[0363] Los portadores adecuados incluyen, entre otros, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales y similares.

[0364] Generalmente, los compuestos de la invención pueden formularse y administrarse de cualquier manera adecuada conocida *per se*. Se hace referencia, por ejemplo, a las técnicas generales citadas anteriormente (y en particular a WO 04/041862, WO 04/041863, WO 04/041865, WO 04/041867 y WO 08/020079), así como a los manuales estándar, como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., Mack Publishing Company, EE.UU. (1990), Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, Lippincott, Williams y Wilkins (2005); o el Manual de Anticuerpos Terapéuticos (S. Dubel, Ed.), Wiley, Weinheim, 2007 (véanse, por ejemplo, las páginas 252-255).

[0365] En un aspecto particular, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención, y que además comprende al menos un portador, diluyente o excipiente y/o adyuvante

farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente comprende uno o más compuestos farmacéuticamente activos adicionales.

[0366] Las formulaciones y los métodos adecuados para prepararlos serán claros para la persona experta y, por ejemplo, incluyen preparaciones preferibles para la administración parenteral (por ejemplo, administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraluminal, intraarterial, intratecal intranasal o intrabronquial) pero también para administración tópica (por ejemplo, intraarticular, transdérmica o intradérmica).

[0367] Los preparados para la administración tópica o parenteral pueden ser, por ejemplo, soluciones estériles, suspensiones, dispersiones o emulsiones adecuadas para perfusión o inyección. Entre los portadores o diluyentes adecuados para dichas preparaciones, por ejemplo, figuran los mencionados en la página 143 del documento WO 08/020079. Por lo general, se preferirán soluciones acuosas o suspensiones.

[0368] La invención también proporciona en un aspecto adicional un kit que comprende al menos un compuesto de acuerdo con la invención. Se contempla que el kit pueda ofrecerse de diferentes formas.

[0369] La invención se describirá ahora con más detalle por medio de los siguientes aspectos, ejemplos y figuras preferidos no limitativos.

EJEMPLOS

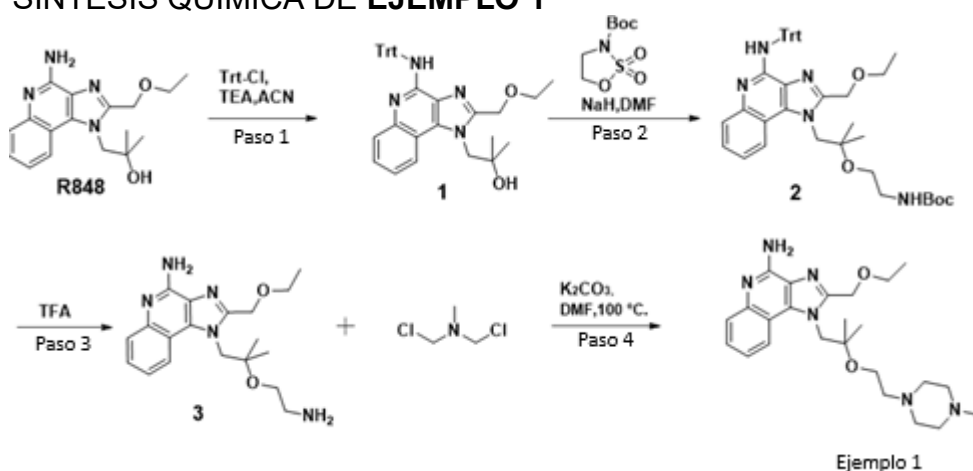
[0370] Los siguientes ejemplos ilustran los métodos de divulgación y los productos de la invención.

[0371] Se diseñaron, prepararon químicamente y evaluaron biológicamente una serie de nuevos agonistas medicados de TLR7, como se describe a continuación con más detalle. Inesperadamente, en comparación con los compuestos del estado de la técnica anterior, como el R484 y algunos agonistas de TLR7/8 recientemente reportados (ver Figura 2), varios de los nuevos agonistas de TLR7 no solo dieron

actividades nanomolares bajas en los experimentos celulares de TLR7, sino que también exhibieron una alta selectividad entre TLR7 y TLR8. Más sorprendentemente aún, estos nuevos agonistas de TLR7 altamente selectivos pueden iniciar una alta producción de citocinas y quimiocinas (IL-6, IL1-b y TNF-a) e inducir una fuerte regulación positiva de CD40 y CD86 en un experimento de monocitos celulares.

6.1 SÍNTESIS QUÍMICA DE LOS AGONISTAS DE TLR7

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 1



PASO 1

[0372] A una solución agitada de R848 (750,00 mg; 2,36 mmol; 1,00 eq.) en acetonitrilo (15,00 ml; 20,00 V) se le añadió trietilamina (0,93 ml; 7,09 mmol; 3,00 eq.) seguido de cloro-(difenil)metil]benceno (1,33 g; 4,72 mmol; 2,00 eq.) bajo atmósfera de nitrógeno. La suspensión resultante se irradió en un reactor de microondas a 100 °C durante 1,15 h. La reacción fue monitoreada por CCM y luego el solvente se retiró al vacío para obtener un crudo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna flash en gel de sílice 100-200 con acetato de etilo y hexano. El producto requerido se eluyó en un 25-30% de acetato de etilo y hexano y los eluyentes se concentraron para proporcionar el compuesto **1** (1,30 g; 2,31 mmol; 97,8 %; sólido blanco; producto purificado).

[0373] Rendimiento: 1,30 g (2,31 mmol), % de rendimiento: 97,8.

[0374] Datos analíticos:

[0375] CL-EM: COLUMN: Atlantis dC18 (50x4,6mm, 5 μ), modo +ve; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min

[0376] RT (min): 2,13; Pureza: 98,94 %; M+H: 557,10.

PASO 2:

[0377] A una solución agitada de hidruro de sodio (179,63 mg; 4,49 mmol; 2,50 eq.) en DMF (10,00 ml) se añadió una solución de compuesto 1 (1,00 g; 1,80 mmol; 1,00 eq.) disuelta en DMF (3 mL). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno durante 30 min, seguido de la adición de terc-butilo 1,2,3-oxatiazolidina-3-carboxilato 2,2-dióxido (441,12 mg; 1,98 mmol; 1,10 eq.). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 12 h y el progreso de la reacción se monitoreó por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se enfrió con agua fría y se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y concentraron para obtener crudo. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice. El producto deseado se eluyó en acetato de etilo al 60 % en éter de PET. Las fracciones puras combinadas se concentraron a presión reducida para obtener el compuesto **2** (550,00 mg; 0,75 mmol; 41,9 %; goma blanquecina; producto purificado).

[0378] Rendimiento: 550,00 mg (0,75 mmol), %Rendimiento: 41,9.

[0379] Datos analíticos:

[0380] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6mm, 5 μ), modo +ve; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min

[0381] RT (min): 2,60; Pureza: 95,70 %; M+H: 700,00.

PASO 3:

[0382] A una solución agitada del compuesto 2 (550,00 mg; 0,75 mmol; 1,00 eq.) en DCM (10,00 ml) se le añadió TFA (0,08 ml; 1,03 mmol; 1,37 eq.) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a RT durante 3 h. El progreso de la reacción fue monitoreado por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se concentró a

presión reducida. El crudo se lavó con éter dietílico (2 x 25 ml), se secó a presión reducida para obtener el compuesto **3** como sal de ácido trifluoroacético (360,00 mg; 0,73 mmol; 97,4 %; sólido blanco pálido; producto purificado)

[0383] Rendimiento: 360,00 mg (0,73 mmol), % de rendimiento: 97,4.

[0384] Datos analíticos:

[0385] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6mm, 5 μ), modo +ve; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min

[0386] RT (min): 0,94; Pureza: 95,90 %; M+H: 358,00.

PASO 4:

[0387] A una solución agitada de sal de ácido trifluoroacético compuesta **3** (200,00 mg; 0,41 mmol; 1,00 eq.) y clorhidrato de bis(2-cloroetil)(metil)amina (0,16 g; 0,81 mmol; 2,00 eq.) en DMF (10,00 ml) se le añadió carbonato de potasio (112,45 mg; 0,81 mmol; 2,00 eq.). La mezcla resultante se calentó a 100 °C y se agitó durante la noche. El progreso de la reacción fue monitoreado por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se dividió entre agua y acetato de etilo. La capa orgánica separada se lavó con solución de salmuera, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo crudo se purificó por HPLC preparatoria utilizando 0,1 %NH₄OAc en agua y acetonitrilo como eluyente, las fracciones requeridas se liofilizaron para obtener **Ejemplo 1** (4,50 mg; 0,01 mmol; 2,4 %; sólido gomoso marrón; producto purificado).

[0388] Rendimiento: 4,50 mg (0,01 mmol), % de rendimiento: 2,4.

[0389] Datos analíticos:

[0390] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6mm, 5 μ), modo +ve; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min

[0391] RT (min): 1,76; Pureza: 95,81 %; M+H: 441,30.

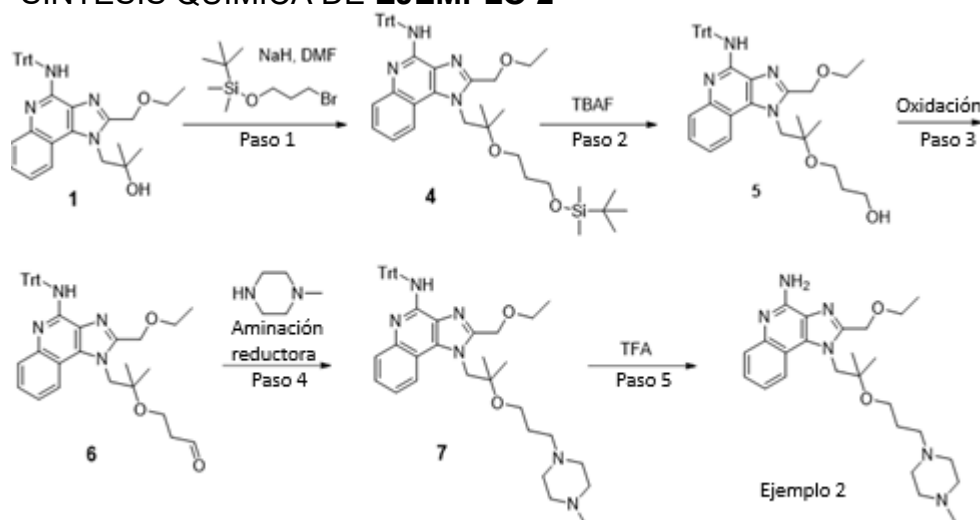
[0392] HPLC: Columna: XBridge C8, 3,5 μ m, 4,6 x 50 mm; Disolvente A: agua + 0,1 % TFA; Disolvente B: ACN + 0,1 % TFA; Fluir: 2 ml/min; Gradiente: 0 min:

5 % B, 8 min 100 % B, 8,1 min 100 % B, 8,5 min 5% B, 10 min 5% B.

[0393] RT (min): 1,72; Pureza: 96,98 % (máx.); Pureza: 88,09 % (220 nm).

[0394] RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 9,12 (s, 2H), 8,55 (d, J = 8,00 Hz, 1H), 7,80 (d, J = 8,00 Hz, 1H), 7,71 (t, J = 8,00 Hz, 1H), 7,54 (t, J = 7,20 Hz, 1H), 4,95 (s, 4H), 3,53 (m, 4H), 3,36 (m, 4H), 2,73-3,29 (m, 4H), 2,51 (s, 3H), 1,22 (s, 6H), 1,16 (t, J = 6,80 Hz, 3H).

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 2



PASO 1:

[0395] A una solución agitada de hidruro de sodio (60%) (158,00 mg; 3,95 mmol; 2,59 eq.) en DMSO (9,00 ml; 10,00 V) a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno se le añadió un compuesto gota a gota **1** (900,00 mg; 1,53 mmol; 1,00 eq.) en DMSO (5 ml) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante 30 min. A continuación, se añadió (3-bromopropoxi)(terc-butilo) dimetilsilano (0,78 ml; 4,77 mmol; 3,12 eq.) a 0 °C y se dejó agitar la mezcla de reacción a RT durante 3 h en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción fue monitoreada por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se enfrió con agua helada a 0 °C y se diluyó con acetato de etilo. La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice. El producto requerido se eluyó con acetato de etilo al 15% en hexano para obtener el compuesto **4** (215,00 mg;

0,28 mmol; 18,4 %; goma; producto purificado).

[0396] Rendimiento: 215,00 mg (0,28 mmol), % de rendimiento: 18,4.

[0397] Datos analíticos:

[0398] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6mm, 5 μ), modo +ve; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min

[0399] RT (min): 3,59; Pureza: 95,53 %; M+H: 729,30.

PASO 2:

[0400] A una solución agitada del compuesto **4** (180,00 mg; 0,24 mmol; 1,00 eq.) en THF (10,00 ml; 55,56 V) se añadió TBAF (1,0M en THF) (1,00 ml; 1,00 mmol; 4,24 eq.) a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a RT durante 3 h y la finalización de la reacción fue confirmada por CCM. La mezcla de reacción se enfrió con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se recolectó y concentró al vacío para obtener el compuesto **5** (150,00 mg; 0,24 mmol; 100 %, goma; producto purificado)

[0401] Rendimiento: 150,00 mg (0,24 mmol), % de rendimiento: 100.

[0402] Datos analíticos:

[0403] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6mm, 5 μ), modo +ve; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min

[0404] RT (min): 2,22; Pureza: 99,51 %; M+H: 615,00.

PASO 3:

[0405] A una solución agitada del compuesto **5** (160,00 mg; 0,26 mmol; 1,00 eq.) en DCM (3,30 ml; 20,63 V) se le añadió 1,1,1-tris(acetiloxy)-1,1-dihidro-1,2-benziodoxol-3-(1H)-ona (0,34 g; 0,77 mmol; 3,00 eq.) a 0°C y la mezcla de reacción se agitó a RT durante 30 min. La finalización de la reacción fue confirmada por CCM. La mezcla de reacción se lavó con una solución de NaHCO₃ al 10%. La capa orgánica se colectó y concentró al vacío para obtener el compuesto **6** (170,00 mg; 0,21 mmol; 81,8 %; líquido incoloro; producto crudo)

[0406] Rendimiento: 170,00 mg (0,21 mmol), %Rendimiento: 81,8.

[0407] Datos analíticos:

[0408] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6mm, 5 μ), modo +ve; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min

[0409] RT (min): 2,36; Pureza: 75,96 %; M+H: 613,00.

PASO 4:

[0410] A una solución agitada del compuesto **6** (170,00 mg; 0,21 mmol; 1,00 eq.) en 1,2-dicloroetano (10,00 ml; 58,82 V) se le añadió 1-metilpiperazina (0,10 ml; 0,96 mmol; 4,55 eq.) en RT. La mezcla de reacción se agitó durante 10 min a RT y se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (300,00 mg; 1,34 mmol; 6,38 eq.) a la mezcla de reacción a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a RT durante 30 min. La finalización de la reacción fue confirmada por CCM. La mezcla de reacción se enfrió con agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se colectó y concentró al vacío para obtener el compuesto **7** (140,00 mg; 0,15 mmol; 71,7 %; goma; producto crudo).

[0411] Rendimiento: 140,00 mg (0,15 mmol), % de rendimiento: 71,7.

[0412] Datos analíticos:

[0413] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6mm, 5 μ), modo +ve; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min

[0414] RT (min): 1,75; Pureza: 75,26 %; M+H: 697,00.

PASO 5:

[0415] A una solución agitada de compuesto **7** (100,00 mg; 0,11 mmol; 1,00 eq.) en DCM (5,00 ml; 50,00 V) se añadió TFA (0,90 ml; 11,60 mmol; 9,00 V) a 0 °C. La solución resultante fue tibia a RT y agitada durante 3 h. La reacción fue monitoreada por CL-EM y luego el solvente se eliminó a presión reducida por debajo de 35 °C para obtener crudo. El crudo se purificó por HPLC preparatoria en el método HCOOH y las fracciones requeridas se liofilizaron para proporcionar **Ejemplo 2** como sal de ácido fórmico (32,91 mg; 0,07 mmol; 60,7 %; goma blanquecina; producto

purificado).

[0416] Rendimiento: 32,91 mg (0,07 mmol), % de rendimiento: 60,7.

[0417] Datos analíticos:

[0418] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6mm, 5 μ), modo +ve; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min

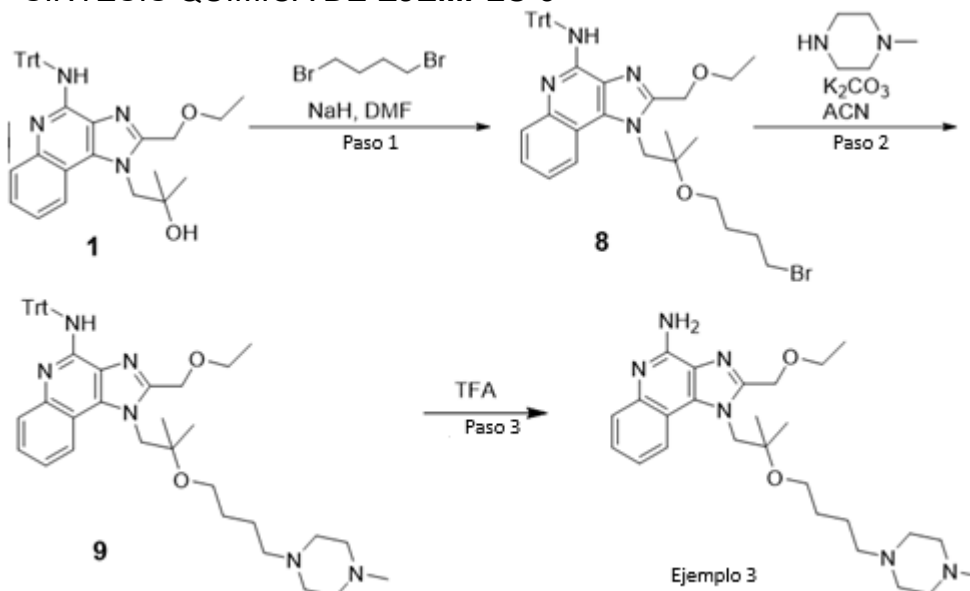
[0419] RT (min): 1,03; M+H: 455,20.

[0420] HPLC: Columna: XBridge C8, 3,5 μ m, 4,6 x 50 mm; Disolvente A: agua + 0,1 % TFA; Disolvente B: ACN + 0,1 % TFA; Fluir: 2 ml/min; Gradiente: 0 min: 5 % B, 8 min 100 % B, 8,1 min 100 % B, 8,5 min 5% B, 10 min 5% B.

[0421] RT (min): 9,52; Pureza: 99,83 % (220 nm).

[0422] ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆): 8,36 (dd, J = 8,00, Hz, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,62 (dd, J = 0,80, 8,20 Hz, 1H), 7,45 (t, J = 7,20 Hz, 1H), 7,25 (t, J = 6,80 Hz, 1H), 6,91 (s, 2H), 4,72 (s, 4H), 3,54-3,53 (m, 2H), 3,24-3,22 (m, 2H), 2,76-2,75 (m, 2H), 2,52-2,50 (m, 11H), 2,10 (m, 2H), 1,42-1,38 (m, 2H), 1,24-1,12 (m, 9H).

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 3



PASO 1:

[0423] A una solución agitada de hidruro de sodio (60%) (0,70 g; 17,50 mmol;

2,41 eq.) en DMSO (40,00 ml; 9,76 V) se le añadió un compuesto **1** (4,10 g; 7,26 mmol; 1,00 eq.) en DMSO (7 ml) a RT bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a RT durante 30 min. Se añadió 1,4-dibromobutano (4,83 ml; 39,46 mmol; 5,43 eq.) a RT y se dejó agitar la mezcla de reacción a RT durante 3 h en atmósfera de nitrógeno. El progreso de la reacción fue monitoreado por CL-EM. La mezcla de reacción se enfrió con agua helada a 0 °C. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo. La capa orgánica se separó, se secó con sulfato de sodio, se filtró, se concentró al vacío para obtener un residuo crudo. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice. El producto se eluyó con acetato de etilo al 15% en hexano para obtener el compuesto **8** (145,00 mg; 0,14 mmol; 2,0 %; goma blanca; producto purificado) y el material de partida sin reaccionar se eluyó con acetato de etilo al 45% en éter de PET para obtener el compuesto **1** (3,20 g; 5,12 mmol; 70,4 %; sólido blanco; producto purificado).

[0424] Rendimiento: 145 mg (0,14 mmol), % de rendimiento: 2,0.

[0425] Datos analíticos:

[0426] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6mm, 5 μ), modo +ve; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal :1,5 ml/min

[0427] RT (min): 2,75; Pureza: 68,10 %; M+H: 690,90.

PASO 2:

[0428] A una solución agitada de compuesto **8** (470,00 mg; 0,67 mmol; 1,00 eq.) y 1-metilpiperazina (0,08 ml; 0,74 mmol; 1,10 eq.) en acetonitrilo (14,10 ml; 30,00 V) se le añadió carbonato de potasio (189,73 mg; 1,35 mmol; 2,00 eq.) en RT. La suspensión se calentó a 50 °C durante 16 h y la reacción fue monitoreada por CCM. Una vez finalizado, se eliminó el solvente para obtener un residuo. El residuo se disolvió en agua y se extrajo con DCM (8 mL). La capa orgánica se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para obtener un material crudo. Este material se purificó mediante cromatografía en columna de gel de

sílice. El producto deseado se eluyó en MeOH al 7 % en DCM para obtener el compuesto **9** (400,00 mg; 0,55 mmol; 82,1 %; polvo blanquecino; producto purificado).

[0429] Rendimiento: 400 mg (0,55 mmol), % de rendimiento: 82,1,

[0430] Datos analíticos:

[0431] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 μ m; Disolvente A; 0,1% de HCOOH en el disolvente B de H₂O:ACN (95:5); ACN; Caudal: 1,5 ml/min.

[0432] RT (min): 1,79; Pureza: 98,20 %.

PASO 3:

[0433] A una solución agitada de compuesto **9** (95,00 mg; 0,11 mmol; 1,00 eq.) en DCM (4,75 ml; 50,00 V) se le añadió TFA (0,36 ml; 4,58 mmol; 40,00 eq.) a 0 °C. La solución resultante fue tibia a RT y agitada durante 3 h. La reacción fue monitoreada por CL-EM. Una vez finalizado, el disolvente se eliminó a presión reducida por debajo de 35 °C para obtener el crudo. El crudo se purificó por HPLC preparatoria en el método HCOOH y las fracciones requeridas se liofilizaron para proporcionar **Ejemplo 3** como sal de ácido fórmico (44,00 mg; 0,08 mmol; 74,1 %; goma blanquecina; producto purificado).

[0434] Rendimiento: 44,00 mg (0,08 mmol), % de rendimiento: 74,1.

[0435] Datos analíticos:

[0436] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 μ m; Disolvente A; 0,1% de HCOOH en el disolvente B de H₂O:ACN (95:5); ACN; Caudal: 1,5 ml/min.

[0437] RT (min): 0,99; Pureza: 99,05 %; M+H: 469,10.

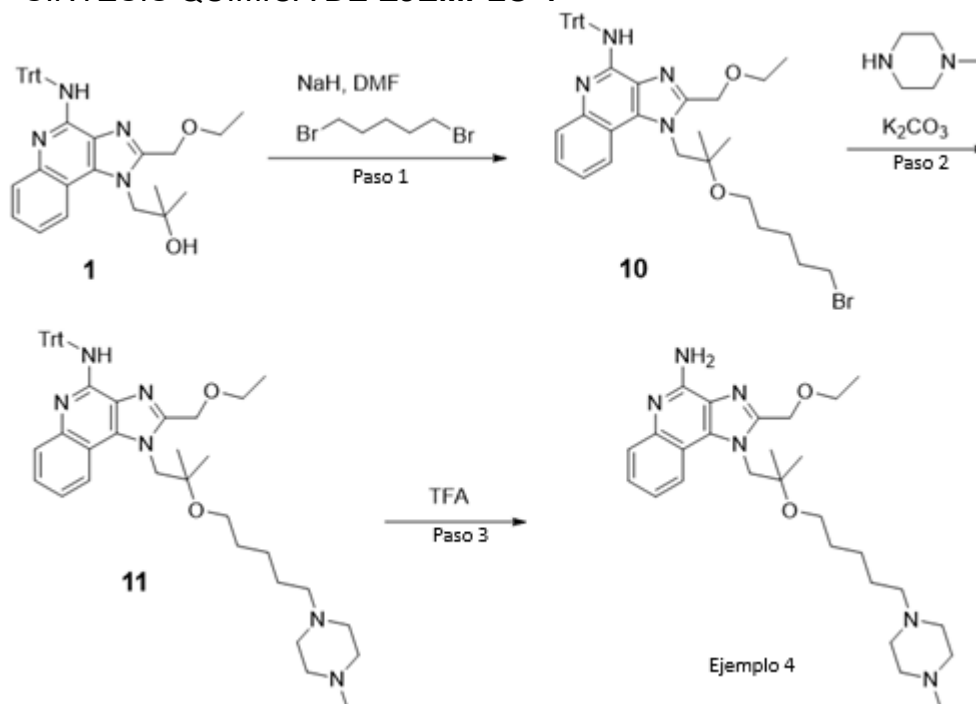
[0438] HPLC: Columna: Phenomenex Gemini C18 (150 * 4,6) mm, 3,0 μ m; Disolvente A: agua+10 mM Acetato de amonio: Disolvente B: Acetonitrilo; Caudal:1,0 ml/min.

[0439] RT (min): 7,96; Pureza: 99,22 % (máx.); Pureza: 97,91 % (220 nm).

[0440] ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆): 8,33 (d, J = 8,40 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 8,40 Hz, 1H), 7,42 (t, J = Hz, 1H), 7,22 (t, J = Hz, 1H), 6,67 (s, 2H), 4,73 (s, 2H), 3,49-

3,54 (m, 6H), 3,20 (t, J = 9,20 Hz, 4H), 2,078-2,335 (m, 11H), 1,13-1,26 (m, 14H), (s, H), (s, H), (s, H), (s, H), (s, H).

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 4



PASO 1:

[0441] A una solución agitada de hidruro de sodio (104,78 mg; 2,62 mmol; 3,00 eq.) en DMSO (10,00 ml; 20,00 V)) se añadió una solución de compuesto **1** (500,00 mg; 0,87 mmol; 1,00 eq.) en DMSO (5 ml) a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 30 min. A continuación, se añadió 1,5-dibromopentano (614,64 mg; 2,62 mmol; 3,00 eq.) y la solución resultante se agitó a RT durante 16 h. La reacción fue monitoreada por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se enfrió con agua fría y se extrajo con acetato de etilo (2x100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron para obtener crudo. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice. El producto deseado se eluyó en acetato de etilo al 16 % en éter de PET. Las fracciones puras combinadas se concentraron a presión reducida para obtener el compuesto **10** (150,00 mg; 0,21

mmol; 23,7 %; goma blanquecina; producto purificado).

[0442] Rendimiento: 150,00 mg (0,21 mmol), % de rendimiento: 23,7.

[0443] Datos analíticos:

[0444] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6mm, 5 μ), modo +ve; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min

[0445] RT (min): 3,32; Pureza: 97,45 %; M+H: 705,30.

PASO 2:

[0446] A una solución agitada del compuesto **10** (150,00 mg; 0,21 mmol; 1,00 eq.) en acetonitrilo (3,00 ml; 20,00 V) se le añadió carbonato de potasio (87,63 mg; 0,62 mmol; 3,00 eq.) y 1-metilpiperazina (0,03 ml; 0,31 mmol; 1,50 eq.) en RT. La suspensión se calentó a 50 °C y se agitó durante 16 h. La reacción fue monitoreada por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida para obtener un residuo crudo. El residuo se disolvió en DCM (100 ml) y se lavó con salmuera (2 x 50 ml). La capa orgánica se concentró bajo una presión reducida para obtener crudo. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice. El producto deseado fue eluido en MeOH al 7 % en DCM. Las fracciones puras combinadas se concentraron a presión reducida para obtener el compuesto **11** (70,00 mg; 0,09 mmol; 41,1 %; goma blanquecina; producto purificado)

[0447] Rendimiento: 70,00 mg (0,09 mmol), % de rendimiento: 41,1,

[0448] Datos analíticos:

[0449] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6mm, 5 μ), modo +ve; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min

[0450] RT (min): 1,72; Pureza: 88,13 %; M+H: 725,20.

PASO 3:

[0451] A una solución agitada del compuesto **11** (70,00 mg; 0,08 mmol; 1,00 eq.) en DCM (3,50 ml; 50,00 V) se le añadió TFA (0,26 ml; 3,32 mmol; 40,00 eq.) a 0 °C. La solución resultante se agitó durante dos horas. La reacción fue monitoreada

por CL-EM. Una vez finalizado, el disolvente se eliminó a presión reducida por debajo de 35 °C para obtener un material crudo. Este material fue purificado por HPLC preparativa en el método HCOOH. Las fracciones requeridas se liofilizaron para obtener **Ejemplo 4** como sal de ácido fórmico (32,00 mg; 0,06 mmol; 72,6 %; goma amarilla pálida; producto purificado).

[0452] Rendimiento: 32,00 mg (0,06 mmol), % de rendimiento: 72,6.

[0453] Datos analíticos:

[0454] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 µm; Disolvente A; 0,1% de HCOOH en el disolvente B de H₂O:ACN (95:5); ACN; Caudal: 1,5 ml/min.

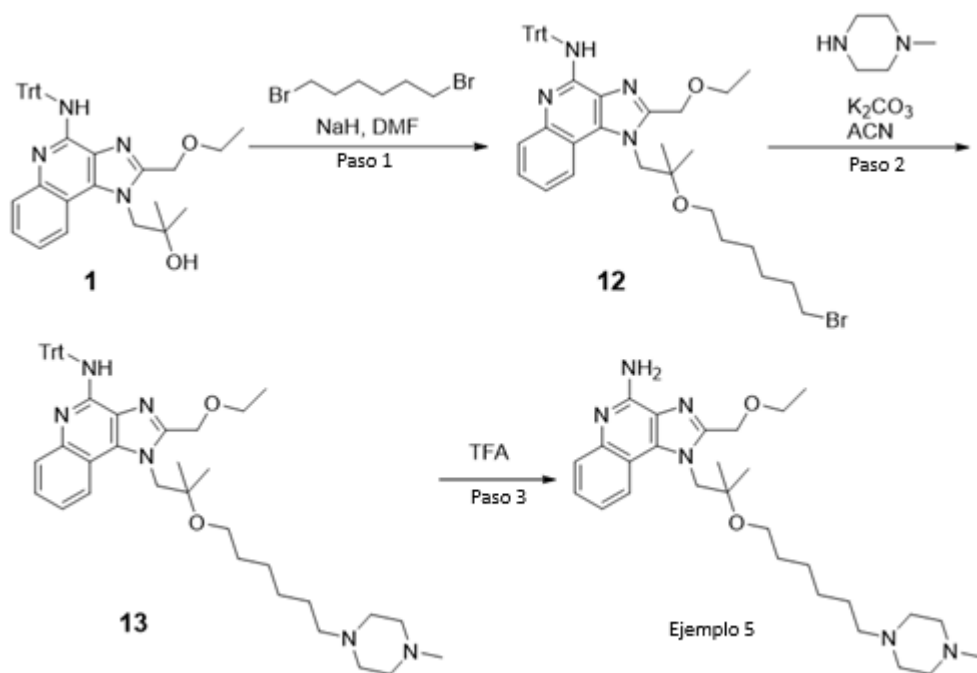
[0455] RT (min): 1,09; Pureza: 99,24 %; M+H: 483,10.

[0456] HPLC: Columna: Phenomenex Gemini C18 (150*4,6) mm, 3,0 µm; Disolvente A: 0,1% de TFA en H₂O:ACN (95:5), Disolvente B: Caudal ACN:1,0 ml/min.

[0457] RT (min): 8,82; Pureza: 99,42 % (máx.); Pureza: 98,26 % (220 nm).

[0458] ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,57 (d, J = 7,60 Hz, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,71-7,79 (m, 1H), 7,67-7,71 (m, 1H), 7,52-7,56 (m, 1H), 4,90 (s, 4H), 3,64 (s, 4H), 3,28-3,33 (m, 8H), 2,86 (s, 3H), 2,43-2,47 (m, 2H), 1,21-1,32 (m, 12H), 0,96 (d, J = 4,40 Hz, 2H).

SÍNTESIS QUÍMICA DE **EJEMPLO 5**



PASO 1:

[0459] A una solución agitada de hidruro de sodio (60%) (122,25 mg; 3,06 mmol; 2,50 eq.) en DMSO (7,00 ml; 10,00 V) a 0 °C se le añadió un compuesto gota a gota **1** (700,00 mg; 1,22 mmol; 1,00 eq.) en DMSO (5 ml) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante 30 min. A continuación, se añadió 1,6-dibromohexano (0,58 ml; 3,67 mmol; 3,00 eq.) a la mezcla de reacción a 0 °C y se dejó agitar la mezcla de reacción a RT durante 16 h bajo atmósfera de nitrógeno. El progreso de la reacción fue monitoreado por CL-EM. La mezcla de reacción se enfrió con agua helada a 0 °C. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y la capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice. El producto requerido se eluyó con acetato de etilo al 15% en hexano para obtener el compuesto **12** (200,00 mg; 0,21 mmol; 17,1 %; aceite blanquecino; producto purificado).

[0460] Rendimiento: 200,00 mg (0,21 mmol), % de rendimiento: 17,1.

[0461] Datos analíticos:

[0462] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6mm, 5 μ), modo +ve; Fase

móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min

[0463] RT (min): 3,26; Pureza: 75,40 %; M+H: 719,00.

PASO 2:

[0464] A una solución agitada de compuesto **12** (200,00 mg; 0,21 mmol; 1,00 eq.) y 1-metil piperazina (0,05 ml; 0,52 mmol; 2,50 eq.) en acetonitrilo (2,00 ml; 10,00 V) se le añadió carbonato de potasio (88,64 mg; 0,63 mmol; 3,00 eq.) en RT. La suspensión se calentó a 50 °C y se agitó durante 16 h. La reacción fue monitoreada por CL-EM. Una vez finalizado, se eliminó el solvente para obtener el residuo. El residuo se disolvió en agua y se extrajo con DCM (20 ml). La capa orgánica se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para obtener el residuo crudo. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice. El producto requerido fue eluido con 8% de MeOH en DCM para obtener el compuesto **13** (110,00 mg; 0,14 mmol; 67,6 %; sólido blanco; producto purificado).

[0465] Rendimiento: 110,00 mg (0,14 mmol), % de rendimiento: 67,6.

[0466] Datos analíticos:

[0467] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6mm, 5μ), modo +ve; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min

[0468] RT (min): 1,79; Pureza: 95,17 %; M+H: 739,00.

PASO 3:

[0469] A una solución agitada de compuesto **13** (110,00 mg; 0,14 mmol; 1,00 eq.) en DCM (5,50 ml; 50,00 V) se le añadió TFA (0,44 ml; 5,67 mmol; 40,00 eq.) a 0 °C. La solución resultante se agitó durante dos horas. El progreso de la reacción fue monitoreado por CL-EM. Una vez finalizado, el disolvente se eliminó a presión reducida por debajo de 35 °C para obtener el crudo. El crudo fue purificado por HPLC preparativa en el método HCOOH. Las fracciones requeridas se liofilizaron para obtener **Ejemplo 5** como sal de ácido fórmico (60,00 mg; 0,11 mmol; 77,1 %; sólido blanco; producto purificado).

[0470] Rendimiento: 60,00 mg (0,11 mmol), % de rendimiento: 77,1.

[0471] Datos analíticos:

[0472] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 μ m; Disolvente A; 0,1% de HCOOH en el disolvente B de H₂O:ACN (95:5); ACN; Caudal: 1,5 ml/min.

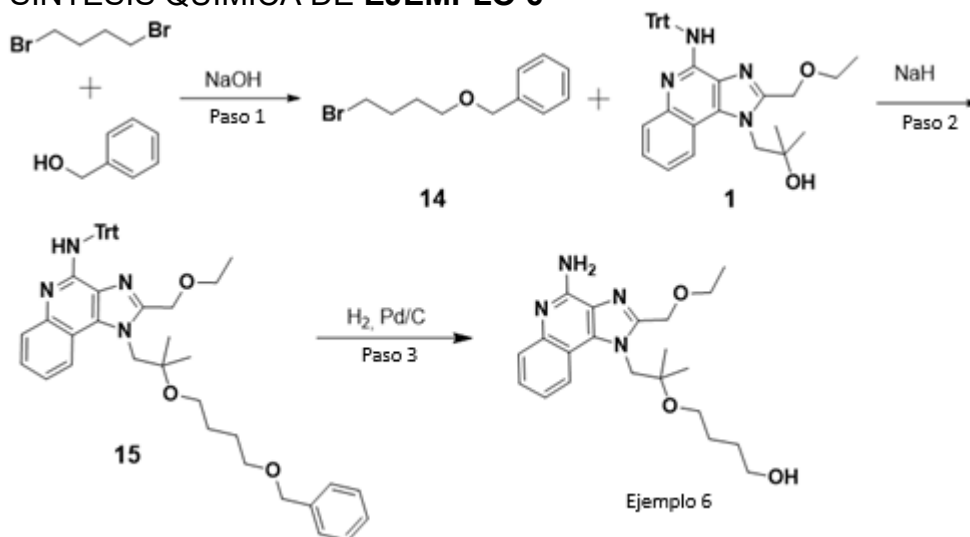
[0473] RT (min): 1,17; Pureza: 98,84 %; M+H: 497,10.

[0474] HPLC: Columna: XBridge C8, 3,5 μ m, 4,6 x 50 mm; Disolvente A: agua + 0,1 % TFA; Disolvente B: ACN + 0,1 % TFA; Fluir: 2 ml/min; Gradiente: 0 min: 5 % B, 8 min 100 % B, 8,1 min 100 % B, 8,5 min 5% B, 10 min 5% B.

[0475] RT (min): 5,39; Pureza: 99,49 % (máx.); Pureza: 99,54 % (220 nm).

[0476] ¹HNMR (400 MHz, MeOD): δ 8,60 (d, J = 8,40 Hz, 1H), 7,80-7,71 (m, 2H), 7,61-7,57 (m, 1H), 4,87-4,84 (m, 6H), 3,67-3,62 (m, 2H), 3,34-3,15 (m, 10H), 2,84-2,79 (m, 5H), 1,53-1,49 (m, 2H), 1,31-1,22 (m, 11H), 1,16-1,09 (m, 4H).

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 6



PASO 1:

[0477] A una solución agitada de alcohol bencílico (1,00 g; 9,20 mmol; 1,00 eq.) en solución acuosa de hidróxido de sodio al 10% (0,92 g; 23,00 mmol; 2,50 eq.) disuelta en agua (20,00 ml; 20,00 V) se le añadió tetra butil-amonio; sulfato de hidrógeno (64,42 mg; 0,18 mmol; 0,02 eq.) seguido de 1,4-dibromobutano (3,99 g; 18,4 mmol; 2 eq.) a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a 70 °C durante 4 h y la

reacción se controló mediante CCM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron para obtener un material crudo. Este material se purificó mediante cromatografía en columna flash en gel de sílice 100-200 con acetato de etilo y hexano. El producto requerido se eluyó en acetato de etilo y hexano al 1-5% y los eluyentes se concentraron para obtener el compuesto **14** (1,00 g; 4,05 mmol; 44,0 %; aceite incoloro; producto purificado)

[0478] Rendimiento: 1 g (4,05 mmol), %Rendimiento: 44.

[0479] Datos analíticos:

[0480] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7,40-7,29 (m, 5H), 4,53 (s, 2H), 3,53 (t, J = -12,40 Hz, 2H), 3,46 (t, J = 6,80 Hz, 2H), 2,04-1,79 (m, 4H).

PASO 2:

[0481] A una suspensión agitada de hidruro de sodio (60%) (179,63 mg; 4,49 mmol; 2,50 eq.) en DMSO (20,00 ml; 20,00 V) a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno. se añadió compuesto gota a gota **1** en DMSO (5 mL) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante 30 min. A continuación, se añadió [(4-bromobutoxi)metilo] benceno (882,33 mg; 3,59 mmol; 2,00 eq.) a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a RT durante 16 h bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción fue monitoreada por CCM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se enfrió con agua helada y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron para obtener un material crudo. Este material se purificó mediante cromatografía en columna flash en gel de sílice 100-200 con acetato de etilo y hexano. El producto requerido se eluyó en acetato de etilo y hexano al 10-15% y los eluyentes se concentraron para proporcionar el compuesto **15** (330,00 mg; 0,45 mmol; 24,8 %; gominola blanquecina; producto purificado)

[0482] Rendimiento: 330 mg (0,45 mmol), % de rendimiento: 24,8.

[0483] Datos analíticos:

[0484] CL-EM: Columna: XBridge C8 (50x4,6 mm) 3,5 μ m; Disolvente A: 0,1% de AGT en H₂O:ACN (95:5), disolvente B: ACN; Caudal: 1,5 ml/min.

[0485] RT (min): 3,35; Pureza: 97,21 %; M+H: 719,3,

PASO 3:

[0486] A una solución agitada del compuesto **15** (100,00 mg; 0,14 mmol; 1,00 eq.) en etanol (5,00 ml) y AcOEt (5,00 ml) se le añadió paladio sobre carbono (100,00 mg; 0,09 mmol; 0,70 eq.) en RT. La mezcla de reacción resultante se agitó a RT bajo 5 kg de presión de hidrógeno en autoclave. Una vez finalizado, la mezcla de reacción se filtró a través de la celita. El filtrado se concentró a presión reducida para obtener un material crudo. Este material se purificó por HPLC preparatoria utilizando 0,1 % de HCOOH en agua y ACN como eluyentes. Las fracciones puras combinadas se liofilizaron para obtener **Ejemplo 6** como sal de ácido fórmico (20,00 mg; 0,05 mmol; 37,9 %; sólido blanquecino; producto purificado).

[0487] Rendimiento: 20 mg (0,05 mmol), % de rendimiento: 37,9.

[0488] Datos analíticos:

[0489] CL-EM: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 μ m; Disolvente A: 0,1% de HCOOH en el disolvente B de H₂O:ACN (95:5); ACN; Caudal: 1,5 ml/min.

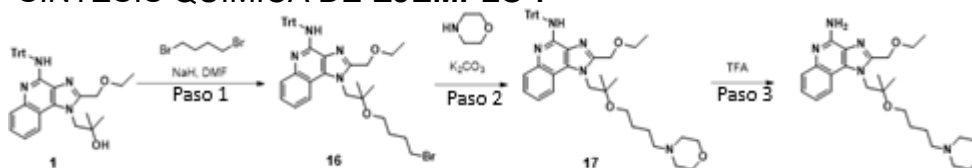
[0490] RT (min): 1,46; Pureza: 99,69 %; M+H: 387,1

[0491] HPLC: Columna: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 μ m; Disolvente A: 0,1% de HCOOH en el disolvente B de H₂O:ACN (95:5); ACN

[0492] RT (min): 7,01; Pureza (máx.): 99,86 %; Pureza (220 nm): 99,32 %.

[0493] ¹RMNH (400 MHz, DMSO-d₆): δ 0,00 (s, 1H), 7,58-7,60 (m, 1H), 7,39-7,43 (m, 1H), 7,20-7,24 (m, 1H), 4,77 (s, 5H), 3,52 (d, J = 7,20 Hz, 2H), 3,35 (t, J = 6,00 Hz, 2H), 3,21 (s, 1H), 1,32 (q, J = 2,00 Hz, 4H), 1,26 (q, J = 10,80 Hz, 4H), 1,14 (q, J = 7,20 Hz, 4H).

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 7



PASO 1:

[0494] A una suspensión de hidruro de sodio (60%) (0,21 g; 5,31 mmol; 2,30 eq.) en DMSO (13,00 ml; 10,00 V), se le añadió gota a gota a 0 una solución de compuesto **1** (1,30 g; 2,31 mmol; 1,00 eq.) en DMSO (13,00 ml; 10,00 V) a 0 °C bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación, se agitó a rt durante 30 min. Se añadió 1,4-dibromobutano (0,76 g; 3,46 mmol; 1,50 eq.) a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a rt durante 1 h adicional. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se enfrió con agua helada y se diluyó con acetato de etilo y la capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio y el solvente se evaporó a presión reducida. El residuo crudo se purificó por cromatografía flash (acetato de etilo al 15% en hexano) para obtener el compuesto **16** (120,00 mg; 0,17 mmol; 7,3 %; sólido blanco; producto purificado).

[0495] Rendimiento: 120,00 mg (0,17 mmol), %Rendimiento: 7,3.

DATOS ANALÍTICOS:

COLUMNA CL-EM: XBRIDGE C8, 3,5 μ M, 4,6 X 50 MM; FASE MÓVIL: A: 0,1% TFT EN H₂O:ACN (95:5); FASE MÓVIL B: 0,1% TFA EN ACN; FLUJO: 1,5 ML/MIN.

RT (MIN): 3,28; PUREZA (MÁX.): 97.18%; M+H: 691,20

PASO 2:

[0496] Se añadió carbonato de potasio (35,67 mg; 0,25 mmol; 3,00 eq.) a una solución de compuesto **16** (3,60,00 mg; 0,08 mmol; 1,00 eq.) y morfolina (22,26 mg; 0,25 mmol; 3,00 eq.) en acetonitrilo (1,80 ml; 30,00 V) a rt. A continuación, la suspensión se calentó a 70 °C y se agitó durante 20 h y el progreso de la reacción fue supervisado por CCM. Una vez finalizado, el disolvente se evaporó y el residuo se

disolvió en agua. Luego se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó con agua y se secó sobre sulfato de sodio y luego el solvente se evaporó a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía flash (60% de EtOAc en éter pet) para obtener el compuesto **17** (60,00 mg; 0,08 mmol; 97,8 %; goma; producto purificado).

[0497] Rendimiento: 60,00 mg (0,08 mmol), % de rendimiento: 97,8.

[0498] Datos analíticos:

[0499] COLUMNA CL-EM: ATLANTIS dC18 (50x4,6 mm) 5 µm; Fase móvil A: 0,1% HCOOH en agua; B: 0,1% HCOOH en ACN; Caudal:0,8 ml/min.

[0500] RT (min): 1,88; Pureza (máx.): 95,95%; M+H: 698,00

PASO 3:

[0501] A una solución agitada del compuesto **17** (5, 60,00 mg; 0,08 mmol; 1,00 eq.) en diclorometano (3,00 ml; 50,00 V) se le añadió TFA (0,20 ml; 2,58 mmol; 3,33 V) a 0 °C. La solución resultante se calentó a rt y se agitó durante otras 3 horas. El progreso de la reacción fue monitoreado por CCM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna flash (metanol al 10% en diclorometano) para proporcionar **Ejemplo 7** (34,00 mg; 0,07 mmol; 89,5 %; goma blanquecina; Producto purificado).

[0502] Rendimiento: 34,00 mg (0,07 mmol), % de rendimiento: 89,5.

[0503] Datos analíticos:

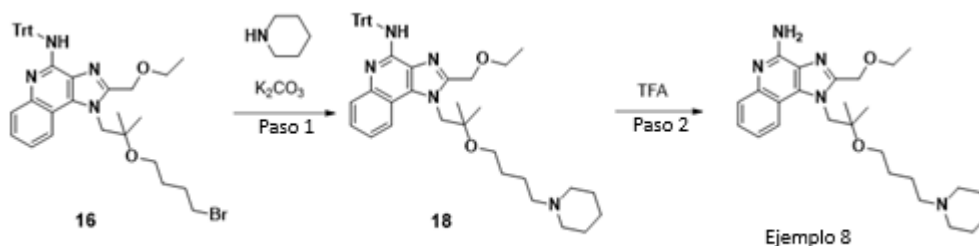
[0504] COLUMNA CL-EM: ATLANTIS dC18 (50x4,6 mm) 5 µm; Fase móvil A: 0,1% HCOOH en agua; B: 0,1% HCOOH en ACN; Caudal:0,8 ml/min.

[0505] RT (min): 1,15; Pureza (máx.): 98,94%; M+H: 456,10.

[0506] Columna HPLC: ATLANTIS dC18 (50x4,6 mm) 5 mm; Fase A móvil: 0,1%TFA en agua MilliQ; Fase B móvil: Acetonitrilo; Caudal: 1,0 ml / min.

[0507] RT (min): 9,25; Pureza (máx.): 95,25%; M+H: 456,10; Pureza (220 nm): 96,41 %.

SÍNTESIS QUÍMICA DE **EJEMPLO 8**



PASO 1:

[0508] A una solución agitada de compuesto **16** (60,00 mg; 0,08 mmol; 1,00 eq.) y piperidina (18,54 mg; 0,21 mmol; 2,50 eq.) en acetonitrilo (1,80 ml; 30,00 V) se le añadió carbonato de potasio (30,09 mg; 0,21 mmol; 2,50 eq.) a RT. La suspensión se calentó a 70 °C con agitación durante 20 h. El progreso de la reacción fue monitoreado por CCM. Una vez completada la reacción, el disolvente se evaporó y el residuo se sometió a cromatografía flash (5% de MeOH en diclorometano) para obtener el compuesto **18** (40,00 mg; 0,06 mmol, 66,9%; goma, producto purificado).

[0509] Rendimiento: 40,00 mg (0,06 mmol), % de rendimiento: 66,9.

[0510] Datos analíticos:

[0511] COLUMNA CL-EM: ATLANTIS dC18 (50x4,6 mm) 5 µm; Fase móvil: A 0,1% HCOOH en H₂O: ACN (95: 5), B: Tasa de flujo ACN: 1,5 ml / min.

[0512] RT (min): 2,01; Pureza (máx.): 99,36%; M+H: 696,1

PASO 2:

[0513] A una solución agitada del compuesto **18** (40,00 mg; 0,06 mmol; 1,00 eq.) en diclorometano (2,00 ml; 50,00 V) se le añadió TFA (0,15 ml; 1,93 mmol; 3,75 V) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó a RT y se agitó durante otras 3 h. El progreso de la reacción fue monitoreado por CCM. Una vez finalizada la reacción, se concentró a presión reducida y el crudo se purificó mediante cromatografía en columna flash (15 % de metanol en diclorometano) para obtener **Ejemplo 8** (16,00 mg; 0,03 mmol; 61,0 %; goma de color marrón claro; producto purificado).

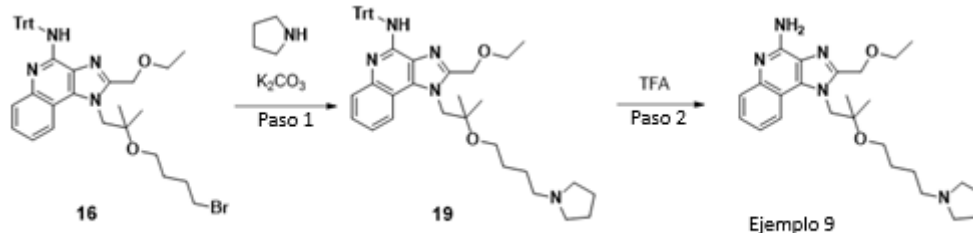
[0514] Rendimiento: 16,00 mg (0,03 mmol), % de rendimiento: 61,0.

[0515] Datos analíticos:

[0516] COLUMNA CL-EM: ATLANTIS dC18 (50x4,6 mm) 5 μ m; Fase móvil: A 0,1% HCOOH en H₂O:ACN (95:5), B:ACN Caudal: 1,5 ml/min.

[0517] RT (min): 1,24; Pureza (máx.): 98,78%; M+H: 454,10.

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 9



PASO 1:

[0518] A una solución agitada de compuesto **16** (60,00 mg; 0,09 mmol; 1,00 eq.) y pirrolidina (19,17 mg; 0,26 mmol; 3,00 eq.) en acetonitrilo (1,20 ml; 20,00 V) se le añadió carbonato de potasio (35,39 mg; 0,26 mmol; 3,00 eq.) en RT. La suspensión se calentó a 70 °C y se agitó durante 20 h y la reacción fue monitoreada por CCM. Una vez completada la reacción, se eliminó el solvente y el residuo se disolvió en agua y luego se extrajo con DCM. La capa orgánica se lavó con agua y se secó sobre sulfato de sodio. A continuación, el disolvente se evaporó a presión reducida y el producto bruto se purificó mediante cromatografía flash (60% de EtOAc en éter pet) para obtener el compuesto **19** (60,00 mg; 0,09 mmol; 99,8 %; goma; producto purificado).

[0519] Rendimiento: 60,00 mg (0,09 mmol), % de rendimiento: 99,8.

[0520] Datos analíticos:

[0521] COLUMNA CL-EM: Columna: ATLANTIS dC18 (50x4,6 mm) 5 mm; Fase móvil: A 0,1% HCOOH en H₂O: ACN (95:5), B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min.

[0522] RT (min): 1,99; Pureza (máx.): 96,78 %; M+H: 682,00.

PASO 2:

[0523] A una solución agitada del compuesto **19** (60,00 mg; 0,08 mmol; 1,00 eq.) en diclorometano (3,00 ml; 50,00 V) se le añadió TFA (0,15 ml; 1,93 mmol; 2,50 V) a 0 °C. La solución resultante se calentó a RT y se agitó durante 3 h. La reacción

fue monitoreada por CCM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna (10% de metanol en diclorometano) para proporcionar **Ejemplo 9** (20,00 mg; 0,05 mmol; 54,3 %; goma blanquecina; producto purificado).

[0524] Rendimiento: 20,00 mg (0,05 mmol), % de rendimiento: 54,3.

[0525] Datos analíticos:

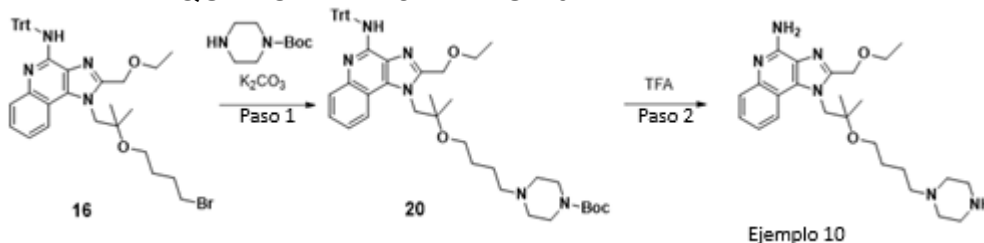
[0526] COLUMNA CL-EM: ATLANTIS dC18 (50x4,6 mm) 5 mm; Fase móvil: A 0,1% HCOOH in H₂O: ACN (95:5), B: Caudal ACN: 1,5 ml / min.

[0527] RT (min): 1,20; Pureza (máx.): 99,56%; M+H: 440,10.

[0528] Columna HPLC: ATLANTIS dC18 (50x4,6 mm) 5 mm; Fase A Móvil: 0,1% TFA en agua MilliQ; Fase B móvil: Acetonitrilo; Caudal: 1,0 ml / min.

[0529] RT (min): 5,76; Pureza (máx.): 99,55%; M+H: 456,10; Pureza (220 nm): 99,42 %.

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 10



PASO 1:

[0530] A una solución agitada de compuesto **16** (50,0 mg; 0,07 mmol; 1,00 eq.) y ácido piperazino-1-carboxílico éster terc-butílico (34,0 mg; 0,18 mmol; 2,50 eq.) en acetonitrilo (1,50 ml; 30,00 V) se le añadió carbonato de potasio (25,23 mg; 0,18 mmol; 2,50 eq.) en RT. La suspensión se calentó a 70 °C y se agitó durante 20 horas. El progreso de la reacción fue monitoreado por CCM. Una vez completada la reacción, se eliminó el solvente y el residuo se volvió a disolver en agua y luego se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó con agua y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se concentró a presión reducida y el producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna flash (60% de EtOAc en éter pet) para

obtener el compuesto **20** (45 mg; 0,06 mmol; 78,5 %; goma, producto purificado).

[0531] Rendimiento: 45,00 mg (0,06 mmol), % de rendimiento: 78,5.

[0532] Datos analíticos:

[0533] Columna CL-EM: Atlantis dC18 (50x4,6 mm, 5 μ m), modo +ve; 0,1% HCOOH en H₂O, B: ACN; Caudal: 1,5 ml/min.

[0534] RT (min): 2,07; Pureza (máx.): 99,44%; M+H: 797,00

PASO 2:

[0535] Se añadió TFA (0,15 ml; 1,93 mmol; 3,33 V) a una solución agitada del compuesto **20** (3, 45,00 mg; 0,06 mmol; 1,00 eq.) en diclorometano (2,25 ml; 50,00 V) a 0 °C. La solución resultante se calentó a RT y se agitó durante 3 h. La reacción fue monitoreada por CL-EM. Una vez finalizado, el disolvente se eliminó a presión reducida por debajo de 35 °C y el producto bruto se purificó por HPLC preparatoria. Las fracciones del producto se liofilizaron para obtener **Ejemplo 10** como sal de ácido fórmico (25,00 mg; 0,05 mmol; 88,1 %; goma blanquecina; producto purificado).

[0536] Rendimiento: 25,00 mg (0,05 mmol), % de rendimiento: 88,1,

[0537] Datos analíticos:

[0538] Columna CL-EM: Atlantis C18 (50x4,6 mm, 5 μ m); Disolvente A: agua + 0,1 % TFA; Disolvente B: ACN + 0,1 % TFA; Fluir: 2 ml/min.

[0539] RT (min): 9,46; Pureza (máx.): 98,13%; M+H: 455,30.

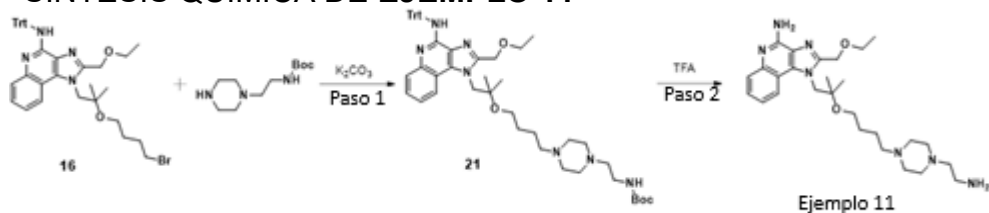
[0540] Columna HPLC: Atlantis dC18 (50x4,6 mm, 5 μ m), modo +ve; Disolvente A: agua + 0,1 % TFA; Disolvente B: ACN + 0,1 % TFA; Fluir: 2 ml/min; Gradiente: 0 min: 5 % B, 8 min 100 % B, 8,1 min 100 % B, 8,5 min 5% B, 10 min 5% B., Caudal: 0,8 mL/min.

[0541] RT (min): 8,47; Pureza (máx.): 99,05%; Pureza (220 nm): 98,46 %.

[0542] ¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 8,56 (d, J = 8,40 Hz, 1H), 8,44 (s, 1H), 7,78 (d, J = 0,52 Hz, 1H), 7,69-7,65 (m, 1H), 7,53-7,49 (m, 1H), 4,91 (m, 4H), 3,67-3,61 (m, 2H), 3,18-3,15 (m, 4H), 2,50 (m, 4H), 2,15-2,06 (m, 2H), 1,32 (m, 6H), 1,28-

1,25 (m, 5H), 1,14-1,11 (m, 2H).

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 11



PASO 1:

[0543] A una solución agitada de éster tercóico-butílico del compuesto **16** (145,00 mg; 0,14 mmol; 1,00 eq.) y (2-piperazina-1-il-etil)-ácido carbámico éster terc-butílico (136,40 mg; 0,57 mmol; 4,00 eq.) en acetonitrilo (4,35 ml; 30,00 V) se le añadió carbonato de potasio (60,40 mg; 0,43 mmol; 3,00 eq.) a RT. La suspensión se calentó a 80 °C y se agitó durante 16 h. La reacción fue monitoreada por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna flash en metanol y DCM. El producto requerido se eluyó en 4-8% de metanol y DCM. Las fracciones se concentraron para obtener el compuesto **21** (105,00 mg; 0,12 mmol; 84,4 %; polvo blanquecino; producto purificado).

[0544] Rendimiento: 105,00 mg (0,12 mmol), % de rendimiento: 84,4

[0545] Datos analíticos:

[0546] CL-EM: Columna: ATLANTIS dC18 (50x4,6 mm) 5 µm; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min

[0547] RT (min): 2,04; Pureza: 96,44%; M+H: 840,10

PASO 2:

[0548] A una solución agitada del compuesto **21** (100,00 mg; 0,11 mmol; 1,00 eq.) en DCM (5,00 ml; 50,00 V) se añadió TFA (0,36 ml; 4,59 mmol; 40,00 eq.) a 0 °C. La solución resultante fue tibia a RT y agitada durante 3 h. La reacción fue monitoreada por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y la mezcla de reacción cruda se purificó por HPLC preparatoria

utilizando 0,1 % de HCOOH en H₂O y ACN. Las fracciones del producto se liofilizaron para obtener **Ejemplo 11** como sal de ácido fórmico (49,00 mg; 0,09 mmol; 77,9 %; goma marrón; producto purificado).

[0549] Rendimiento: 49 mg (0,09 mmol), % de rendimiento: 77,9

[0550] Datos analíticos:

[0551] CL-EM: Columna: XBridge C8, 3,5 μ m, 4,6 x 50 mm; Fase móvil: A :0,1% TFA en H₂O B: ACN;

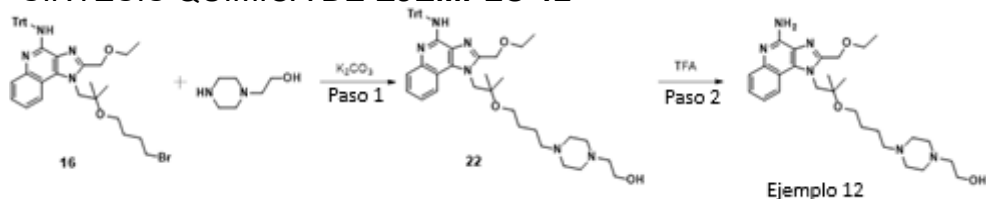
[0552] Caudal: 1,5 ml / min.

[0553] RT (min): 0. 1,88; Pureza: 99,42%; M+H: 498,30

[0554] HPLC: Columna :ATLANTIS dC18 (50x4,6mm) 5 μ m; Disolvente A: agua + 0,1 % TFA; Disolvente B: ACN + 0,1 % TFA; Fluir: 2 ml/min; Gradiente: 0 min: 5 % B, 8 min 100 % B, 8,1 min 100 % B, 8,5 min 5% B, 10 min 5% B. RT (min): 4,09; Pureza (máx.): 99,14%; Pureza (220 nm): 99,53%.

[0555] ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,44 (d, J = 8,40 Hz, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,51-7,67 (m, 5H), 7,34 (t, J = 7,60 Hz, 1H), 4,75 (s, 4H), 3,52 (t, J = 6,80 Hz, 3H), 3,38 (s, 2H), 3,21 (s, 2H), (s, 3H), 2,66 (s, 2H), 2,51 (d, J = 2,00 Hz, 3H), 2,46 (d, J = 36,00 Hz, 3H), 1,13-1,20 (m, 13H), (s, H).

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 12



PASO 1:

[0556] A una solución agitada de compuesto **16** (60,00 mg; 0,08 mmol; 1,00 eq.) y 2-(piperazin-1-il)etano-1-ol (20,30 mg; 0,15 mmol; 2,00 eq.) en acetonitrilo (1,80 ml; 30,00 V) se le añadió carbonato de potasio (32,33 mg; 0,23 mmol; 3,00 eq.) a RT. La suspensión se calentó a 80 °C y se agitó durante 16 h. La reacción fue monitoreada por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se dividió entre agua y acetato

de etilo, la capa orgánica separada se lavó con solución de salmuera, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para obtener un producto crudo del compuesto **22** (47,00 mg; 0,06 mmol; 80,3 %; polvo blanquecino; producto crudo).

[0557] Rendimiento: 47 mg (0,06 mmol), % de rendimiento: 80,3

[0558] Datos analíticos:

[0559] CL-EM: Columna: XBridge C8, 3,5 μ m, 4,6 x 50 mm; Fase móvil: A :0,1% TFA en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml/min.

[0560] RT (min): 2,60; Pureza: 96,73%; M+H: 741,30

PASO 2:

[0561] A una solución agitada de compuesto **22** (45,00 mg; 0,06 mmol; 1,00 eq.) en DCM (2,25 ml; 50,00 V) se añadió TFA (0,18 ml; 2,35 mmol; 40,00 eq.) a 0 °C. La solución resultante fue tibia a RT y agitada durante 3 h. La reacción fue monitoreada por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El producto crudo se purificó por HPLC preparatoria utilizando 0,1 % de HCOOH en H₂O y ACN. Las fracciones del producto se liofilizaron para obtener **Ejemplo 12** como sal de ácido fórmico (19,00 mg; 0,03 mmol; 56,5 %; goma blanquecina; producto purificado).

[0562] Rendimiento: 19 mg (0,03 mmol), % de rendimiento: 56,5

[0563] Datos analíticos:

[0564] CL-EM: Columna: ATLANTIS dC18 (50x4,6 mm) 5 μ m; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml / min

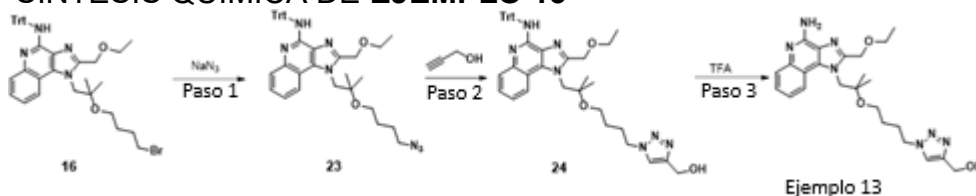
[0565] RT (min): 0,98; Pureza: 97,32%; M+H: 499,10

[0566] HPLC: Columna :ATLANTIS dC18 (50x4,6mm) 5 μ m; Disolvente A: agua + 0,1 % TFA; Disolvente B: ACN + 0,1 % TFA; Fluir: 2 ml/min; Gradiente: 0 min: 5 % B, 8 min 100 % B, 8,1 min 100 % B, 8,5 min 5% B, 10 min 5% B. RT (min): 9,14; Pureza (máx.): 95,04%; Pureza (220 nm): 92,88%.

[0567] ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,54 (d, J = 0,80 Hz, 2H), 7,76 (d, J

= 0,80 Hz, 1H), 7,65-7,74 (m, 1H), 7,45-7,49 (m, 1H), 3,77 (t, J = 11,20 Hz, 2H), 3,65 (t, J = 14,00 Hz, 3H), 2,81-2,89 (m, 6H), 2,69 (s, 4H), 2,36 (s, 2H), 2,00 (s, 3H), 1,15-1,33 (m, 14H), (s, H), (s, H), (s, H),

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 13



PASO 1:

[0568] A una solución agitada de compuesto **16** (180,00 mg; 0,25 mmol; 1,00 eq.) y azida sódica (20,00 mg; 0,30 mmol; 1,20 eq.) en DMF (3,60 ml; 20,00 V). La suspensión se agitó durante 3 h en RT. La reacción fue monitoreada por CCM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en agua y se extrajo con DCM (8 mL). La capa orgánica se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para obtener un producto crudo del compuesto **23** (150,00 mg; 0,15 mmol; 57,7 %; polvo blanquecino; producto crudo).

[0569] Rendimiento: 150 mg (0,15 mmol), % de rendimiento: 57,7

[0570] Datos analíticos:

[0571] CL-EM: Columna: XBridge C8, 3,5 μ m, 4,6 x 50 mm; Fase móvil: A :0,1% TFA en H₂O; B: ACN;

[0572] Caudal :1,5 ml/min

[0573] RT (min): 3,24; Pureza: 63,86%; M+H: 654,30.

PASO 2:

[0574] A una solución de compuesto **23** (70,00 mg; 0,07 mmol; 1,00 eq.) y prop-2-yn-1-ol (3,91 mg; 0,07 mmol; 1,00 eq.) en THF (1,40 ml; 20,00 V) se le añadió yoduro de cobre (I) (7,90 mg; 0,04 mmol; 0,60 eq.) y etil-diisopropil-amina (0,01 ml; 0,07 mmol; 1,00 eq.). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 3 h. La reacción

fue monitoreada por CCM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua y solución de salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para obtener un producto crudo. Este producto crudo se purificó por cromatografía en columna utilizando metanol/DCM como eluyente, el producto deseado se eluyó en metanol al 8% en DCM. Las fracciones requeridas se evaporaron para obtener el compuesto **24** (40,00 mg; 0,05 mmol; 70,6 %; sólido blanco; producto purificado).

[0575] Rendimiento: 40 mg (0,05 mmol), % de rendimiento: 70,6

[0576] Datos analíticos:

[0577] CL-EM: Columna: ATLANTIS dC18 (50x4,6 mm) 5 µm; Fase móvil: A :0,1% HCOOH en H₂O B: ACN; Caudal: 1,5 ml/min.

[0578] RT (min): 2,23; Pureza: 85,71%; M+H: 710,00

PASO 3:

[0579] A una solución agitada del compuesto **24** (40,00 mg; 0,05 mmol; 1,00 eq.) en DCM (2,00 ml; 50,00 V) se le añadió TFA (0,30 ml; 3,87 mmol; 7,50 V) a 0 °C. La solución resultante fue tibia a RT y agitada durante 3 h. La reacción fue monitoreada por CCM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna utilizando metanol/DCM como eluyente, el producto deseado se eluyó en metanol al 15% en DCM. Las fracciones requeridas se evaporaron para obtener **Ejemplo 13** (18,00 mg; 0,04 mmol; 76,5 %; goma marrón clara; producto purificado)

[0580] Rendimiento: 18 mg (0,04 mmol), % de rendimiento: 76,5.

[0581] Datos analíticos:

[0582] CL-EM: Columna: XBridge C8, 3,5 µm, 4,6 x 50 mm; Fase móvil: A :0,1% TFA en H₂O B: ACN;

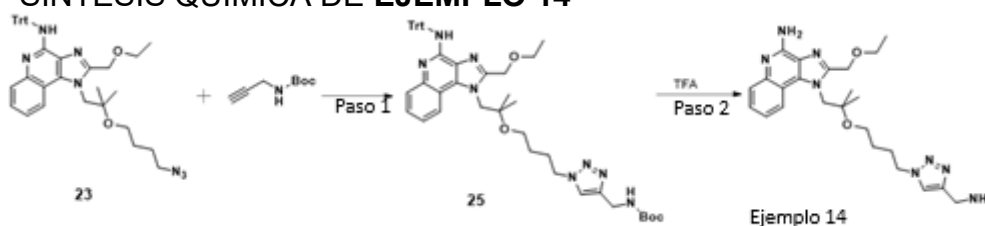
[0583] Caudal :1,5 ml/min

[0584] RT (min): 2,10; Pureza: 97,88%; M+H: 468,20

[0585] HPLC: Columna: Phenomenex Gemini C18 (150 * 4,6) mm, 3,0µm; Fase móvil A: acetato de amonio de 10 mM en agua milli-q; Fase móvil B: Acetonitrilo; Caudal:1,0 ml/min.

[0586] RT (min): 8,10; Pureza (máx.): 95,26%; Pureza (220 nm): 90,72%

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 14



PASO 1:

[0587] A una solución de compuesto **23** (90,00 mg; 0,13 mmol; 1,00 eq.) y terc-butil N-(prop-2-yn-1-il)carbamato (20,99 mg; 0,13 mmol; 1,00 eq.) en THF (1,80 ml; 20,00 V) se les añadió yoduro de cobre (I) (15,30 mg; 0,08 mmol; 0,60 eq.) y etil diisopropilamina (0,05 ml; 0,27 mmol; 2,00 eq.). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 3 h. La reacción fue monitoreada por CCM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua y solución de salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para obtener un compuesto crudo. Este producto crudo se purificó por cromatografía en columna utilizando metanol/DCM como eluyente, el producto deseado se eluyó en metanol al 8% en DCM. Las fracciones requeridas se evaporaron para obtener el compuesto **25** (50,00 mg; 0,06 mmol; 45,2 %; sólido blanco; producto purificado).

[0588] Rendimiento: 50 mg (0,06 mmol), %Rendimiento: 45,2.

[0589] Datos analíticos:

[0590] CL-EM: Columna: ATLANTIS dC18 (50x4,6 mm) 5 mm; Fase móvil A: 0,1% HCOOH en agua; B: 0,1% HCOOH en ACN; Caudal:0,8 ml/min.

[0591] RT (min): 2,51; Pureza: 96,95%; M+H: 809,00

PASO 2:

[0592] A una solución agitada del compuesto **25** (50,00 mg; 0,07 mmol; 1,00

eq.) en DCM (3,00 ml; 60,00 V) se añadió TFA (0,30 ml; 3,87 mmol; 6,00 V) a 0 °C. La solución resultante fue tibia a RT y agitada durante 3 h. La reacción fue monitoreada por CCM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida para obtener un producto crudo. Este producto crudo se purificó por cromatografía en columna mediante el uso de metanol/DCM como eluyente, el producto deseado se eluyó en metanol al 15% en DCM. Las fracciones requeridas se evaporaron para obtener **Ejemplo 14** (15,00 mg; 0,03 mmol; 46,2 %; goma blanquecina; producto purificado).

[0593] Rendimiento: 15 mg (0,03 mmol), % de rendimiento: 46,2

[0594] Datos analíticos:

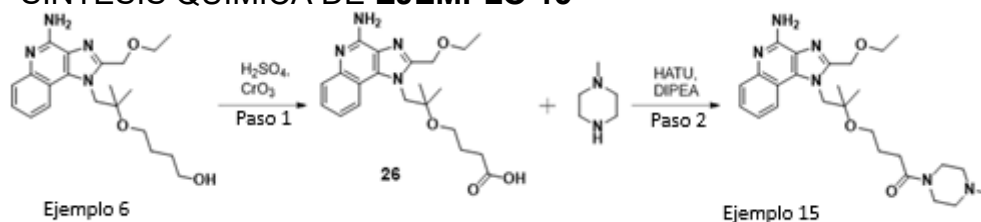
[0595] CL-EM: Columna: XBridge C8, 3,5 µm, 4,6 x 50 mm; Fase móvil: A :0,1% TFA en H₂O:ACN (95:5); Fase móvil B: 0,1%TFA en ACN; Caudal: 1,5 ml / min.

[0596] RT (min): 1,98; Pureza: 99,94%; M+H: 467,20

[0597] HPLC: Columna: ATLANTIS dC18 (50x4,6 mm) 5 mm; Fase A Móvil: 0,1%TFA en agua MilliQ; Fase B móvil: Acetonitrilo; Caudal :1,0 ml/min.

[0598] RT (min): 5,42; Pureza (máx.): 99,86%; Pureza (220 nm): 99,30%.

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 15



PASO 1:

[0599] A una solución agitada de **Ejemplo 6** (5, 50,00 mg; 0,13 mmol; 1,00 eq.) en acetona (2,00 ml; 40,00 V) se le añadió ácido sulfúrico y trioxocromo (0,10 ml) a 0° C. La mezcla de reacción resultante se agitó a RT durante 1 h. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El crudo resultante se lavó con éter dietílico (10 mL) para obtener el compuesto **26** (45,00 mg; 0,10 mmol; 81,1 %; goma azul; producto crudo). El crudo

se utilizaba directamente para el siguiente paso.

[0600] Rendimiento: 45,00 mg (0,10 mmol), % de rendimiento: 81,1,

[0601] Datos analíticos:

[0602] Columna CL-EM: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 μ m; Disolvente A; 0,1% HCOOH en H₂O: ACN (95:5) Disolvente B; ACN; Caudal: 1,5 mL/min.

[0603] RT (min): 1,47; Pureza (máx.): 92,18%; M+H: 401,10.

PASO 2:

[0604] A una solución agitada del compuesto **26** (40,00 mg; 0,09 mmol; 1,00 eq.) en DMF (0,40 ml; 10,00 V) se le añadió [Dimetilamino-([1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina-3-iloxi)-metileno]-dimetil-amonio; hexafluoro fosfato (67,06 mg; 0,17 mmol; 2,00 eq.). Luego se añadió con etil-diisopropil-amina (0,05 ml; 0,26 mmol; 3,00 eq.) y 1-metilpiperazina (0,02 ml; 0,17 mmol; 2,00 eq.) a 0° bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación, la mezcla de reacción se agitó a RT durante 2 h adicionales. El progreso de la reacción fue monitoreado por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se liofilizó y el producto crudo se purificó por HPLC preparatoria. Las fracciones del producto se liofilizaron para obtener **Ejemplo 15** como sal de ácido fórmico (13,00 mg; 0,02 mmol; 26,6 %; goma marrón; producto purificado).

[0605] Rendimiento: 13,00 mg (0,02 mmol), % de rendimiento: 26,6.

[0606] Datos analíticos:

[0607] Columna CL-EM: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 μ m; Disolvente A; 0,1% HCOOH en H₂O: ACN (95:5) Disolvente B; ACN; Caudal: 0,8 mL/min.

[0608] RT (min): 8,48; Pureza (máx.): 94,47%; M+H: 483,20.

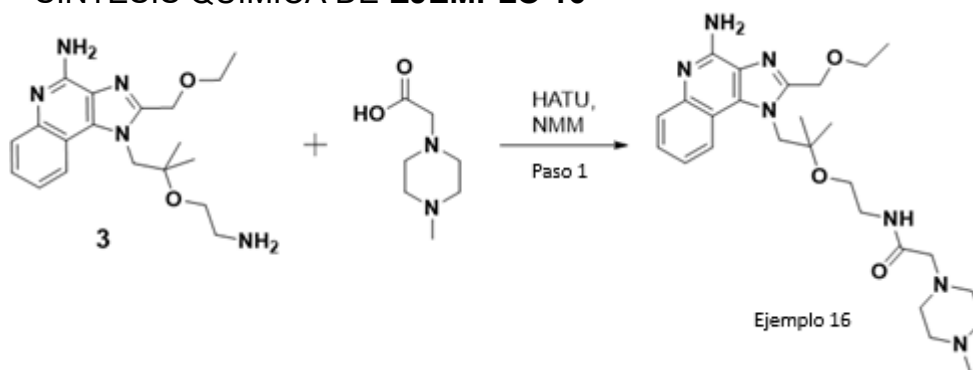
[0609] Columna HPLC: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 μ m; Disolvente A: 0,1% TFA en H₂O:ACN (95:5), Disolvente B:ACN, Caudal: 0,8 mL/min.

[0610] RT (min): 5,21; Pureza (máx.): 94,95%; Pureza (220 nm): 92,87 %.

[0611] ¹RMN-H (400 MHz, CD₃OD-d₆): δ 8,83 (d, J = 8,00 Hz, 1H), 7,72 (d, J = 8,40 Hz, 1H), 7,58 (t, J = 7,60 Hz, 1H), 7,41 (t, J = 7,20 Hz, 1H), 4,88 (s, 4H), 3,65

(t, J = 6,80 Hz, 2H), 3,61 (s, 2H), 3,50 (d, J = 3,20 Hz, 2H), 3,15 (d, J = 4,00 Hz, 2H), 2,34 (s, 6H), 1,91 (t, J = 6,80 Hz, 2H), 1,58 (q, J = 6,00 Hz, 2H), 1,27 (q, J = 7,20 Hz, 11H).

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 16



PASO 1:

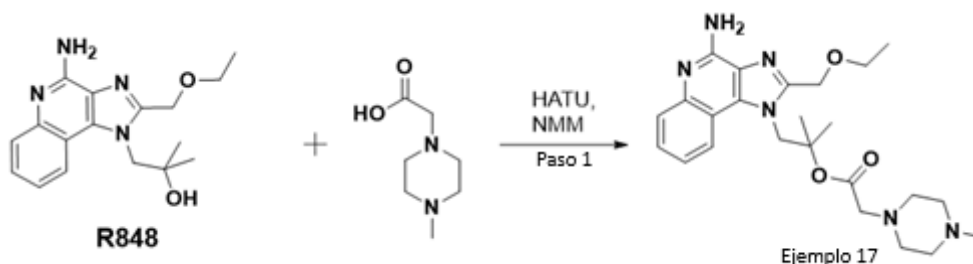
[0612] El ácido acético (4-metil-piperazina-1-il) (10.000 mg; 1,00 eq.) se disolvió en DMF (1,000 ml) y se enfrió a 0 °C. Luego 4-metilmorfolina (17,374 µl; 2,50 eq.), [Dimetilamino-([1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina-3-iloxi)-metileno]-dimetil-amonio; Se añadió hexafluoro fosfato (26.439 mg; 1,10 eq.) y finalmente el compuesto **3** (23.222 mg; 1,00 eq.). La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. La solución de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por HPLC preparatoria eluida con agua/acetonitrilo (0,1% TFA). El producto que contenía fracciones se combinó y liofilizó durante la noche para obtener **Ejemplo 16** como sal de ácido trifluoroacético (31,00 mg; 0,050 mmol; 79%) como un sólido transparente.

[0613] Datos analíticos:

[0614] HPLC-MS: columna: cromolito HR C18 5,0µm; 50-4,6 mm; Información del método (cromolito) : A: H₂O + 0,05% HCOOH | B: MeCN + 0,04% HCOOH | T: 40 °C | Fluir: 3,3 ml/min | SRA.: 100-2000 UMA Positivo | 1% ->100% B: 0 -> 2,0min | 100% B: 2,0 ->2,5 min

[0615] RT (min): 0,98; Pureza (máx.): 98,3%; M+H: 498,6.

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 17



PASO 1:

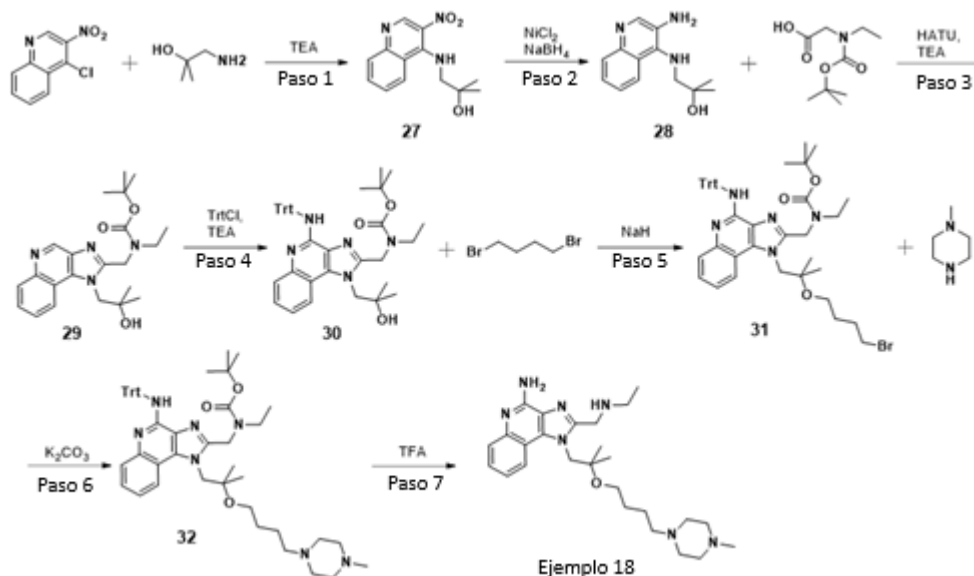
[0616] El ácido R848 (20,00 mg; 0,062 mmol; 1,0 eq.), el ácido 2-(4-metilpiperazina-1-il)acético (29,588 mg; 0,187 mmol; 3,0 eq.) y la 4-(pirrolidin-1-il)piridina (13,860 mg; 0,094 mmol; 1,5 eq.) se combinaron con diclorometano (2.000 ml) para obtener una suspensión blanca. Se añadió N,N'-diisopropilcarbodiimida (0,029 ml; 0,187 mmol; 3,0 eq.). La mezcla de reacción se calentó a 50 °C durante la noche. Una vez finalizada, la solución se inyectó directamente en una HPLC preparatoria eluida con agua/acetonitrilo (0,1% TFA). Las fracciones que contenían el producto se unieron y liofilizaron durante la noche para obtener **Ejemplo 17** como una sal de ácido trifluoroacético (8,5 mg; 22,5%, aceite transparente, producto purificado)

[0617] Datos analíticos:

[0618] HPLC-MS: columna: cromolito HR C18 5,0µm; 50-4,6 mm; Información del método (cromolito) : A: H₂O + 0,05% HCOOH | B: MeCN + 0,04% HCOOH | T: 40 °C | Fluir: 3,3 ml/min | SRA.: 100-2000 UMA Positivo | 1% ->100% B: 0 -> 2,0min | 100% B: 2,0 ->2,5 min

[0619] RT (min): 0,97; Pureza (máx.): 94,0%; M+H= 455

SÍNTESIS QUÍMICA DE **EJEMPLO 18**



PASO 1:

[0620] A la solución de 4-cloro-3-nitroquinolina (4,50 g; 21,14 mmol; 1,00 eq.) disuelta en DCM (45,00 ml; 10,00 V) se le añadió trietilamina (9,00 ml; 63,42 mmol; 3,00 eq.) seguida de 1-amino-2-metilpropan-2-ol (3,81 g; 42,28 mmol; 2,00 eq.) a RT. La mezcla de reacción se refluxó durante 3 h. La reacción fue monitoreada por CCM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se concentró al vacío y se añadió agua, se formó el sólido y se filtró al vacío para obtener el compuesto **27** (5,30 g; 19,93 mmol; 94,3 %; sólido amarillo; producto purificado).

[0621] Rendimiento: 5,30 g (19,93 mmol), % de rendimiento: 94,3.

[0622] Datos analíticos:

[0623] Columna CL-EM: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 μ m; Disolvente A; 0,1% HCOOH en H₂O: ACN (95:5) Disolvente B; ACN; Caudal: 0,8 mL/min.

[0624] RT (min): 0,436; Pureza (máx.): 98,27%; M+H: 260,20.

PASO 2:

[0625] A una solución de compuesto **27** (5,30 g; 20,28 mmol; 1,00 eq.) en un disolvente de agua (4,58 ml; 0,86 V) y metanol (50,00 ml; 9,43 V) se le añadió cloruro de níquel (II) hexahidratado (0,19 g; 0,80 mmol; 0,04 eq.) seguido de borohidruro de sodio (1,57 g; 40,67 mmol; 2,00 eq.) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a RT

durante 2 h. La reacción fue monitoreada por CCM. Una vez finalizada, la solución negra se filtró a través de la celita y el filtrado se concentró para obtener un producto crudo. A continuación, el producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna flash (3% de MeOH en DCM) para obtener el compuesto **28** (4,20 g; 16,55 mmol; 81,6 %; polvo de naranja; producto purificado).

[0626] Rendimiento: 4,20 g (16,55 mmol), % de rendimiento: 81,6.

[0627] Datos analíticos:

[0628] Columna CL-EM: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 μ m; Disolvente A; 0,1% HCOOH en H₂O: ACN (95:5) Disolvente B; ACN; Caudal: 0,8 mL/min.

[0629] RT (min): 0,37; Pureza (máx.): 91,11%; M+H: 232,20.

PASO 3:

[0630] A una solución agitada del compuesto **28** (4,20 g; 18,16 mmol; 1,00 eq.) en DMF (42,00 ml; 10,00 V) se añadieron 2-[[[(terc-butoxi)carbonilo](etil)amino]ácido acético (5,59 g; 27,24 mmol; 1,50 eq.), [Dimetilamino-([1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina-3-iloxi)-metileno]-dimetil-amonio; hexafluoro fosfato (20,92 g; 54,48 mmol; 3,00 eq.), trietilamina (7,14 ml; 54,48 mmol; 3,00 eq.) y 4-dimetilaminopiridina (0,22 g; 1,82 mmol; 0,10 eq.). La mezcla de reacción se agitó a RT durante 3 h. La reacción fue monitoreada por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se concentró al vacío para obtener un residuo. El residuo se diluyó con DCM y se lavó con agua, la capa orgánica se colectó y se concentró al vacío para obtener un intermedio, el cual se disolvió en etanol (84,00 ml; 20,00 V) y se adicionó hidróxido de sodio (1,02 g; 2,54 mmol; 0,14 eq.) en agua (2,10 ml; 0,50 V) a RT. La reacción de ciclación se reflujo durante 6 h y la reacción se monitorizó por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se concentró al vacío para obtener un producto crudo. El producto crudo se purificó por cromatografía en gel de sílice utilizando MeOH al 7% en DCM para obtener como compuesto **29** (4,90 g; 9,27 mmol; 51,0 %; sólido claro marrón; producto purificado).

[0631] Rendimiento: 4,90 g (9,27 mmol), %Rendimiento: 51,0.

[0632] Datos analíticos:

[0633] Columna CL-EM: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 μ m; Disolvente A; 0,1% HCOOH en H₂O: ACN (95:5) Disolvente B; ACN; Caudal: 0,8 mL/min.

[0634] RT (min): 0,67; Pureza (máx.): 82.73%; M+H: 399,20.

PASO 4:

[0635] A una solución agitada del compuesto **29** (0,80 g; 1,92 mmol; 1,00 eq.) en acetonitrilo (24,00 ml; 30,00 V) se le añadió trietilamina (1,36 ml; 9,58 mmol; 5,00 eq.) seguido de [cloro(difenil)metil]benceno (1,08 g; 3,83 mmol; 2,00 eq.) bajo atmósfera de nitrógeno. La suspensión resultante se calentó a 100 °C y se agitó durante 16 horas. La reacción fue monitoreada por CCM. Una vez finalizado, se retiró el solvente para obtener un producto crudo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna flash en silicagel 60-120 con acetato de etileto y éter PET. El producto fue eluido en 40-100% de etilacetato y éter de PET y los eluyentes se concentraron para proporcionar el compuesto **30** (800,00 mg; 1,22 mmol; 63,6 %; sólido blanco; producto purificado).

[0636] Rendimiento: 800,00 mg (1,22 mmol), % de rendimiento: 63,6.

[0637] Datos analíticos:

[0638] Columna CL-EM: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 μ m; Disolvente A; 0,1% HCOOH en H₂O: ACN (95:5) Disolvente B; ACN; Caudal: 0,8 mL/min.

[0639] RT (min): 1,14; Pureza (máx.): 93,25%; M+H: 656,20.

PASO 5:

[0640] A una solución estimulada de NaH (60%) (0,05 g; 1,19 mmol; 1,50 eq.) en DMSO (5,60 ml; 10,00 V) a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno se le añadió un compuesto gota a gota **30** (0,56 g; 0,80 mmol; 1,00 eq.) en DMSO (5,60 ml; 10,00 V) y la mezcla de reacción se agitó a RT durante 30 min. A continuación, se añadió 1,4-dibromobutano (0,53 g; 2,39 mmol; 3,00 eq.) a 0°C y se dejó agitar la mezcla de

reacción a RT durante 1 h bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción fue monitoreada por CCM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se enfrió con agua helada a 0 °C. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y la capa orgánica se separó, se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El producto crudo se purificó por cromatografía en gel de sílice y el producto se eluyó con acetato de etilo al 15% en hexano. Las fracciones requeridas se evaporaron para obtener el compuesto **31** (23,00 mg; 0,03 mmol; 3,6 %; goma blanca; producto purificado).

[0641] Rendimiento: 23,00 mg (0,03 mmol), % de rendimiento: 3,6.

[0642] Datos analíticos:

[0643] Columna HPLC: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 µm; Disolvente A: 0,1% TFA en H₂O:ACN (95:5), Disolvente B:ACN, Caudal: 0,8 mL/min.

[0644] RT (min): 3,09; Pureza (máx.): 96,95%; M+H: 790,30.

PASO 6:

[0645] A una solución agitada de compuesto **31** (80,00 mg; 0,08 mmol; 1,00 eq.) y 1-metil piperazina (0,01 ml; 0,09 mmol; 1,10 eq.) en acetonitrilo (2,40 ml; 30,00 V) se le añadió carbonato de potasio (23,91 mg; 0,17 mmol; 2,00 eq.) a RT. La suspensión se calentó a 50 °C y se agitó durante 16 horas. La reacción fue monitoreada por CL-EM. Una vez finalizado, se retiró el solvente para obtener un producto crudo. El producto crudo se disolvió en agua y se extrajo con DCM (8 mL). La capa orgánica se lavó con agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para obtener el compuesto **32** (55,00 mg; 0,06 mmol; 67,4 %; goma blanquecina; producto purificado).

[0646] Rendimiento: 55,00 mg (0,06 mmol), % de rendimiento: 67,4.

[0647] Datos analíticos:

[0648] Columna CL-EM: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 µm; Disolvente A: 0,1% HCOOH en H₂O: ACN (95:5) Disolvente B; ACN; Caudal: 0,8 mL/min.

[0649] RT (min): 1,70; Pureza (máx.): 84,18%; M+H: 810,40.

PASO 7:

[0650] A una solución agitada del compuesto **32** (55,00 mg; 0,04 mmol; 1,00 eq.) en DCM (2,75 ml; 50,00 V) se le añadió TFA (0,13 ml; 1,70 mmol; 40,00 eq.) a 0 °C. La solución resultante fue tibia a RT y agitada durante 3 h. La reacción fue monitoreada por CL-EM. Una vez finalizado, el disolvente se eliminó a presión reducida por debajo de 35 °C para obtener un producto crudo. El producto crudo se purificó por HPLC preparatoria en el método TFA y la fracción del producto se liofilizó para obtener **Ejemplo 18** como una sal de ácido trifluoroacético (13,10 mg; 0,02 mmol; 51,6 %; goma blanca; producto purificado).

[0651] Rendimiento: 13,10 mg (0,02 mmol), % de rendimiento: 51,6.

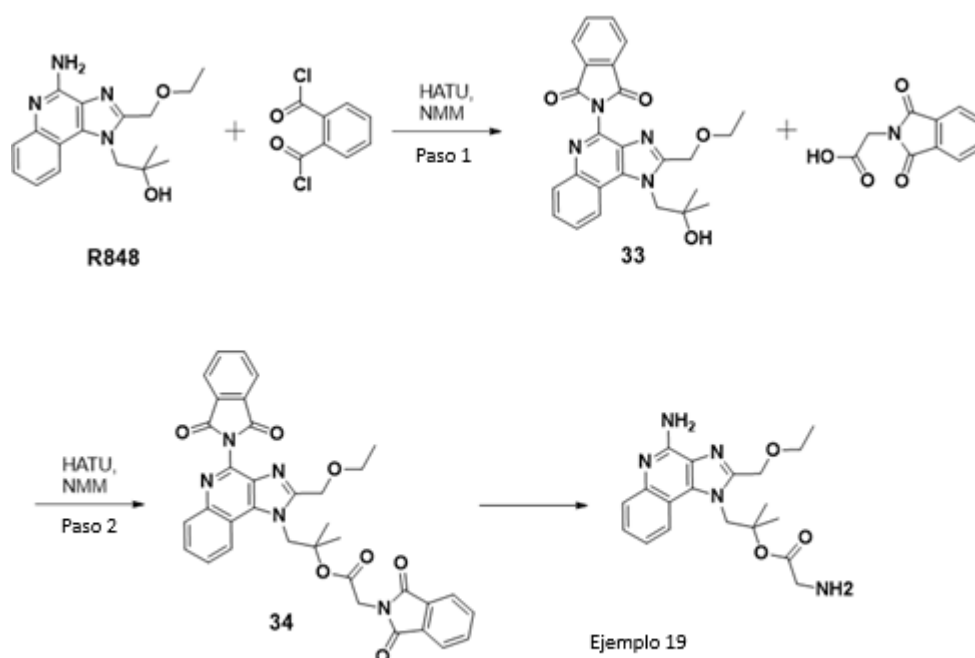
[0652] Datos analíticos:

[0653] Columna HPLC: Atlantis dC18 (50x4,6 mm) 3,5 µm; Disolvente A: 0,1% TFA en H₂O:ACN (95:5), Disolvente B:ACN, Caudal: 0,8 mL/min.

[0654] RT (min): 8,32; Pureza (máx.): 97,35%; M+H: 468,30.

[0655] ¹RMN-H (400 MHz, DMSO-d₆): δ 9,23 (s, br, 2H), 8,99 (s, br, 2H), 8,61 (d, J = 8,00 Hz, 1H), 7,83 (d, J = 8,00 Hz, 1H), 7,75 (t, J = 15,20 Hz, 1H), 7,55 (t, J = 15,20 Hz, 1H), 4,68 (s, br, 6H), 3,19- 2,22 (m, 15H), 1,20-1,31 (m, 13H).

SÍNTESIS QUÍMICA DE **EJEMPLO 19**



PASO 1:

[0656] Se añadió R848 (18,00 mg; 0,057 mmol; 1,0 eq.) al tolueno (2,00 ml) para obtener una suspensión blanca. Se añadieron 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (0,017 ml; 0,170 mmol; 3,0 eq.) y dicloruro de ftalailo (0,010 ml; 0,068 mmol; 1,2 eq.). La mezcla de reacción se agitó a 110 °C durante 2 h y se controló por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla se enfrió y luego se diluyó con acetato de etilo y se lavó con HCl 1N. Se separó la fase orgánica y se extrajo la capa de agua con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron en vacío para dar un producto crudo del compuesto **33** (25,20 mg, 0,070 mmol, goma blanca; producto crudo), que se utilizó sin mayor purificación en la siguiente reacción.

[0657] Datos analíticos:

[0658] HPLC-MS: columna: cromolito HR C18 5,0µm; 50-4,6 mm; Información del método (cromolito): A: H₂O + 0,05% HCOOH | B: MeCN + 0,04% HCOOH | T: 40 °C | Fluir: 3,3 ml/min | SRA.: 100-2000 UMA Positivo | 1% ->100% B: 0 -> 2,0min | 100% B: 2,0 ->2,5 min

[0659] RT (min): 1,50; Pureza (máx.): 30,81 %; M+H= 445

PASO 2:

[0660] El compuesto **33** obtenido de la etapa 1 como material bruto (18,00 mg; 0,040 mmol; 1,0 eq.), ácido (1,3-Dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-acético (24,93 mg; 0,121 mmol; 3,0 eq.) y 4-(pirrolidin-1-il)piridina (9,00 mg; 0,061 mmol; 1,5 eq.) se combinaron con DCM (2,00 ml) para dar una suspensión blanca. Se añadieron N,N'-diisopropilcarbodiimida (0,019 ml; 0,121 mmol; 3,0 eq.) y tamices moleculares. La mezcla de reacción se calentó a 50 °C durante la noche y se controló por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se purificó mediante una RP-HPLC preparatoria eluida con agua/acetonitrilo (0,1% de TFA). Las fracciones que contenían el producto se unieron y liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto **34** (16,70 mg, 0,02 mmol, 61,0 %, polvo blanco, producto purificado).

[0661] Rendimiento: 16,70 mg (0,02 mmol), % de rendimiento: 61,0.

[0662] Datos analíticos:

[0663] HPLC-MS: columna: cromolito HR C18 5,0µm; 50-4,6 mm; Información del método (cromolito) : A: H₂O + 0,05% HCOOH | B: MeCN + 0,04% HCOOH | T: 40 °C | Fluir: 3,3 ml/min | SRA.: 100-2000 UMA Positivo | 1% ->100% B: 0 -> 2,0min | 100% B: 2,0 ->2,5 min

[0664] RT (min): 1,725; Pureza (máx.): 93,5 %; M+H= 631,7.

PASO 3:

[0665] El compuesto **34** (16.700 mg; 0,026 mmol; 1,0 eq.) se combinó con THF (2,00 ml) para dar una suspensión blanca. A esta suspensión se le añadió solución de hidracina en agua (35%) (0,057 ml; 0,624 mmol; 23,6 eq.) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y se monitorizó por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se inyectó directamente en una HPLC preparatoria eluida con agua/acetonitrilo (0,1% TFA). Las fracciones que contenían el producto se unieron y liofilizaron durante la noche hasta **Ejemplo 19** como una sal de ácido

trifluoroacético (3,70 mg; 0,01 mmol; 29,0 %; polvo blanco; producto purificado).

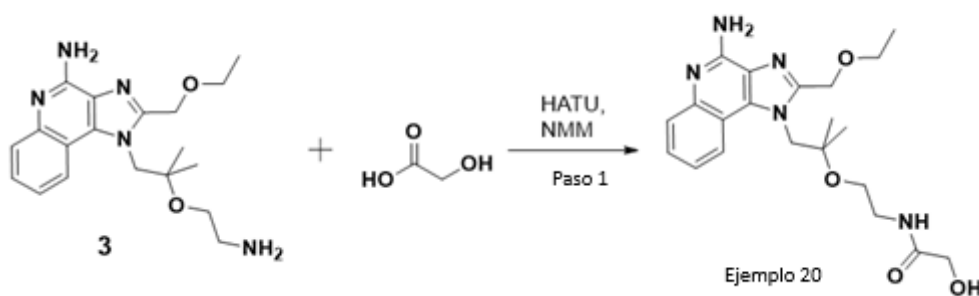
[0666] Rendimiento: 3,70 mg (0,01 mmol), % de rendimiento: 29,0.

[0667] Datos analíticos:

[0668] HPLC-MS: columna: cromolito HR C18 5,0µm; 50-4,6 mm; Información del método (cromolito) : A: H₂O + 0,05% HCOOH | B: MeCN + 0,04% HCOOH | T: 40 °C | Fluir: 3,3 ml/min | SRA.: 100-2000 UMA Positivo | 1% ->100% B: 0 -> 2,0min | 100% B: 2,0 ->2,5 min

[0669] RT (min): 0,902; Pureza (máx.): 100 %; M+H= 371,9.

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 20



[0670] El ácido glicólico (6,482 mg; 1,00 eq.) se disolvió en DMF (2,00 ml), luego 4-metilmorfolina (0,023 ml; 2,50 eq.) y [Dimetilamino-([1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina-3-iloxi)-metileno]-dimetil-amonio; Se añadió hexafluoro fosfato (35,294 mg; 1,10 eq.) y se agitó durante 10 minutos. Finalmente se añadió el compuesto **3** (31,00 mg; 1,00 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y fue monitoreada por CL-EM. Después de la reacción durante la noche, el material de partida no se convirtió completamente en el producto, por lo tanto, a la mezcla se le agregó una solución de ácido glicólico (6.482 mg; 1,00 eq.), [Dimetilamino-([1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina-3-iloxi)-metileno]-dimetil-amonio; hexafluoro fosfato (35,294 mg; 1,10 eq.) y 4-metilmorfolina (0,023 ml; 2,50 eq.) en DMF (0,500 ml) y se agitó de nuevo durante la noche y se controló con CL-EM. Una vez finalizada, la solución de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por HPLC

preparatoria eluida con agua/acetonitrilo (0,1% TFA). El producto que contenía fracciones se combinó y liofilizó durante la noche para proporcionar **Ejemplo 20** (17,10 mg; 0,041 mmol; 48,8%; sólido blanquecino; producto purificado).

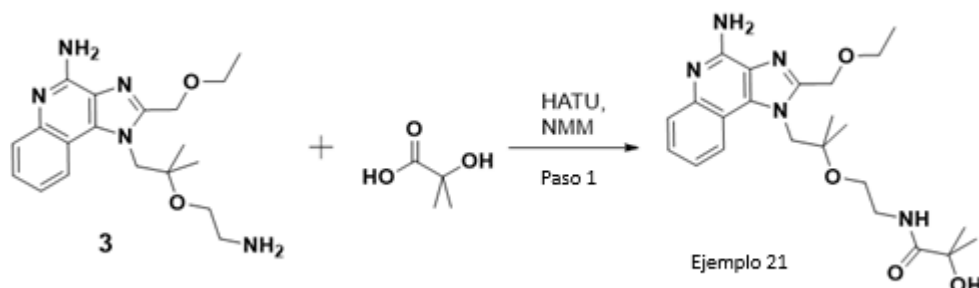
[0671] Rendimiento: 17,10 mg (0,041 mmol), % de rendimiento: 48,8.

[0672] Datos analíticos:

[0673] HPLC-MS: columna: cromolito HR C18 5,0µm; 50-4,6 mm; Información del método (cromolito) : A: H₂O + 0,05% HCOOH | B: MeCN + 0,04% HCOOH | T: 40 °C | Fluir: 3,3 ml/min | SRA.: 100-2000 UMA Positivo | 1% ->100% B: 0 -> 2,0min | 100% B: 2,0 ->2,5 min

[0674] RT (min): 1,10; Pureza (máx.): 99,9 %; M+H= 416,1.

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 21



[0675] El ácido 2-hidroxiisobutírico (8,675 mg; 1,00 eq.) se disolvió en DMF (2,000 ml), luego 4-metilmorfolina (0,018 ml; 2,00 eq.) y [Dimetilamino-([1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina-3-iloxi)-metileno]-dimetil-amonio; Se añadieron hexafluorofosfato (31,050 mg; 1,00 eq.) y se agitaron durante 10 minutos. Finalmente se añadió el compuesto **3** (30.000 mg; 1,00 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se controló por CL-EM. La solución de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por HPLC preparatoria eluida con agua/acetonitrilo (0,1% TFA). El producto que contenía fracciones se combinó y liofilizó durante la noche para obtener **Ejemplo 21** como sal de ácido trifluoroacético (29.000 mg; 0,052 mmol; 63,7%; sólido blanco, producto purificado).

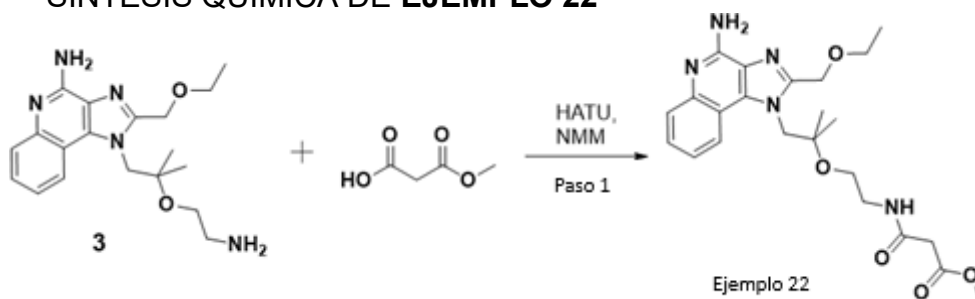
[0676] Rendimiento: 29.000 mg (0,052 mmol), %Rendimiento: 63,7.

[0677] Datos analíticos:

[0678] HPLC-MS: columna: cromolito HR C18 5,0µm; 50-4,6 mm; Información del método (cromolito) : A: H₂O + 0,05% HCOOH | B: MeCN + 0,04% HCOOH | T: 40 °C | Fluir: 3,3 ml/min | SRA.: 100-2000 UMA Positivo | 1% ->100% B: 0 -> 2,0min | 100% B: 2,0 ->2,5 min

[0679] RT (min): 1.103; Pureza (máx.): 100 %; M+H= 444,0.

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 22



[0680] El éster monometílico del ácido malónico (14,248 µl; 1,00 eq.) se disolvió en DMF (2.000 ml), luego 4-metilmorfolina (0,030 ml; 2,00 eq.) y [Dimetilamino-([1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina-3-iloxi)-metileno]-dimetil-amonio; Se añadió hexafluoro fosfato (51,750 mg; 1,00 eq.) y se agitó durante 10 minutos. Finalmente se añadió el compuesto **3** (50.000 mg; 1,00 eq.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se controló por CL-EM. La solución de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por HPLC preparatoria eluida con agua/acetonitrilo (0,1% TFA). El producto que contenía fracciones se combinó y liofilizó durante la noche para obtener **Ejemplo 22** como sal de ácido trifluoroacético (52,300 mg; 0,084 mmol; 61,9 %; vidrio transparente sólido; producto purificado).

[0681] Rendimiento: 52.300 mg (0,084 mmol), %Rendimiento: 61,9.

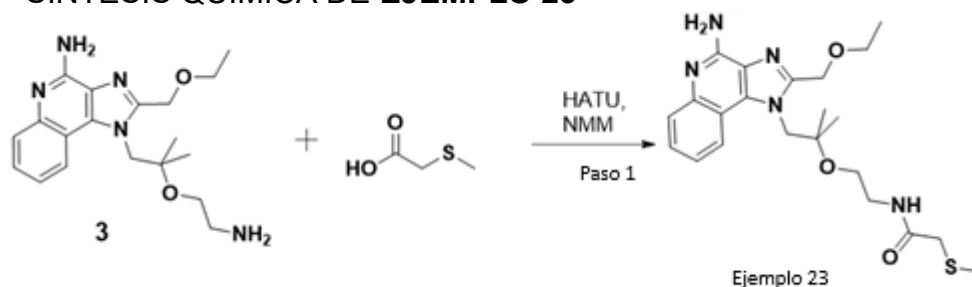
[0682] Datos analíticos:

[0683] HPLC-MS: columna: cromolito HR C18 5,0µm; 50-4,6 mm; Información del método (cromolito) : A: H₂O + 0,05% HCOOH | B: MeCN + 0,04%

HCOOH | T: 40 °C | Fluir: 3,3 ml/min | SRA.: 100-2000 UMA Positivo | 1% ->100% B:
0 -> 2,0min | 100% B: 2,0 ->2,5 min

[0684] RT (min): 1,11; Pureza (máx.): 92,0 %; M+H= 458,0.

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 23



[0685] El ácido meHTIL tioacético (8,203 µl; 1,00 eq.) se disolvió en DMF (2.000 ml). N-etil diisopropilamina (79,306 µl; 5,00 eq.) y [Dimetilamino-([1,2,3]triazolo-[4,5-b]piridina-3-iloxi)-metileno]-dimetil-amonio; Se añadió hexafluoro fosfato (70,927 mg; 2,00 eq.) y se agitó durante 20 min, seguido de la adición del compuesto **3** (33,339 mg; 1,00 eq.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se controló por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se purificó mediante preparación. HPLC sobre una columna Sunfire eluida con agua/acetonitrilo (0,1% TFA). Las fracciones que contenían el producto se combinaron, concentraron y liofilizaron para obtener **Ejemplo 23** como sal de ácido trifluoroacético (16.500 mg; 0,028 mmol; 30,3 %; beige sólido; producto purificado).

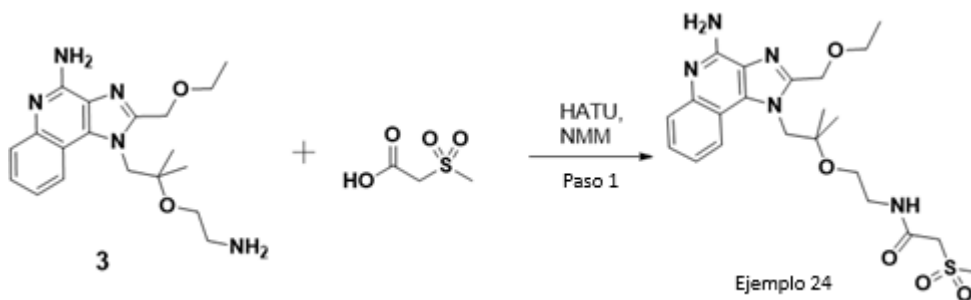
[0686] Rendimiento: 16.500 mg (0,028 mmol), %Rendimiento: 30,3.

[0687] Datos analíticos:

[0688] HPLC-MS: columna: cromolito HR C18 5,0µm; 50-4,6 mm; Información del método (cromolito) : A: H₂O + 0,05% HCOOH | B: MeCN + 0,04% HCOOH | T: 40 °C | Fluir: 3,3 ml/min | SRA.: 100-2000 UMA Positivo | 1% ->100% B: 0 -> 2,0min | 100% B: 2,0 ->2,5 min

[0689] RT (min): 1,177; Pureza (máx.): 95,9 %; M+H= 446,2.

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 24



[0690] El ácido metano sulfonyl acético (12,058 mg; 0,087 mmol; 1,2 eq.) se disolvió en DMF (2.000 ml). 4-metilmorfolina (15,994 µl; 0,145 mmol; 2,0 eq.) y [Dimetilamino-([1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina-3-iloxy)-metileno]-dimetil-amonio; Se añadieron hexafluorofosfato (33,188 mg; 0,087 mmol; 1,2 eq.) y se agitaron durante 10 min, seguido de la adición del compuesto **3** (26,000 mg; 0,073 mmol; 1,0 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante la noche y se monitoreó con CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se purificó mediante una HPLC preparatoria eluida con agua/acetonitrilo (0,1% TFA). Las fracciones que contenían el producto se recolectaron y liofilizaron durante la noche para obtener **Ejemplo 24** como sal de ácido trifluoroacético (9,10 mg; 0,01 mmol; 20,5 %; sólido beige claro; producto purificado).

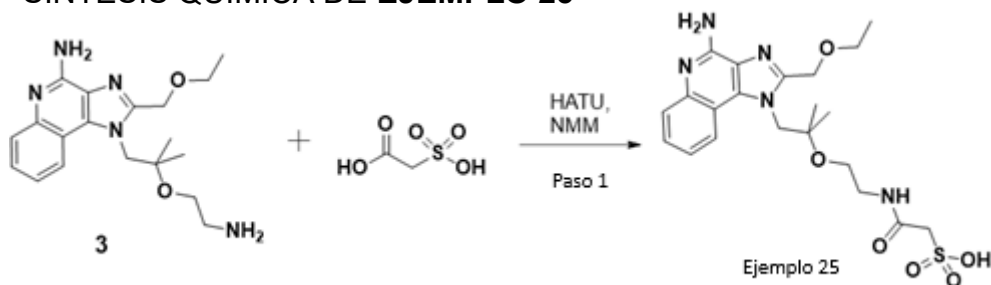
[0691] Rendimiento: 9,10 mg (0,01 mmol), % de rendimiento: 20,5.

[0692] Datos analíticos:

[0693] HPLC-MS: columna: cromolito HR C18 5,0µm; 50-4,6 mm;
Información del método (cromolito) : A: H2O + 0,05% HCOOH | B: MeCN + 0,04%
HCOOH | T: 40 °C | Fluir: 3,3 ml/min | SRA.: 100-2000 UMA Positivo | 1% ->100% B:
0 -> 2,0min | 100% B: 2,0 ->2,5 min

[0694] RT (min): 1,14; Pureza (máx.): 97,0 %; M+H= 478,1.

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 25



[0695] El ácido 2-sulfoacético (12,740 mg; 0,087 mmol; 1,2 eq.) se disolvió en DMF (2.000 ml). 4-metilmorfolina (15,994 µl; 0,145 mmol; 2,0 eq.) y [Dimetilamino-([1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina-3-iloxi)-metileno]-dimetil-amonio; Se añadieron hexafluorofosfato (33,188 mg; 0,087 mmol; 1,2 eq.) y se agitaron durante 10 min, seguido de la adición del compuesto **3** (26,000 mg; 0,073 mmol; 1,0 eq.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se controló por CL-EM. Una vez finalizada, la mezcla de reacción se purificó mediante una HPLC preparatoria eluida con agua/acetonitrilo (0,1% TFA). Las fracciones que contenían el producto se recolectaron y liofilizaron durante la noche para obtener **Ejemplo 25** como sal de ácido trifluoroacético (26,3 mg; 0,04 mmol; 60,3 %; polvo blanco; producto purificado).

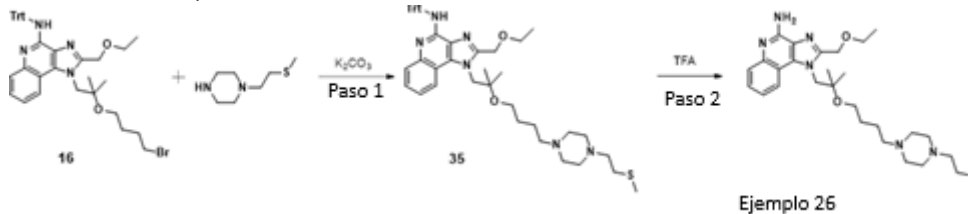
[0696] Rendimiento: 26,3 mg (0,04 mmol), %Rendimiento: 60,3.

[0697] Datos analíticos:

[0698] HPLC-MS: columna: cromolito HR C18 5,0µm; 50-4,6 mm; Información del método (cromolito) : A: H2O + 0,05% HCOOH | B: MeCN + 0,04% HCOOH | T: 40 °C | Fluir: 3,3 ml/min | SRA.: 100-2000 UMA Positivo | 1% ->100% B: 0 -> 2,0min | 100% B: 2,0 ->2,5 min

[0699] RT (min): 1.108; Pureza (máx.): 99 %; M+H= 480,1.

SÍNTESIS QUÍMICA DE EJEMPLO 26



PASO 1:

[0700] A una solución de compuesto **16** (200,00 mg; 0,29 mmol; 1,00 eq.) y 1-[2-(metilsulfanil)etil]piperazina (69,52 mg; 0,43 mmol; 1,50 eq.) en acetonitrilo (4,000 ml), se añadió carbonato de potasio (122,33 mg; 0,87 mmol; 3,00 eq.) y se agitó a 60 °C durante la noche. La reacción fue monitoreada por CCM. Una vez

finalizada la reacción, la mezcla de reacción se concentró y purificó el residuo bruto mediante cromatografía en gel de sílice utilizando metanol al 10%: DCM para proporcionar el compuesto **35** (152,73 mg; 0,19 mmol; 67,3 %; Producto purificado).

[0701] Rendimiento: 152,73 mg (0,19 mmol), % de rendimiento: 67,3.

[0702] Datos analíticos:

[0703] HPLC: Columna: XBridge C8, 3,5 μ m, 4,6 x 50 mm; Disolvente A: agua + 0,1 % TFA; Disolvente B: ACN + 0,1 % TFA; Fluir: 2 ml/min; Gradiente: 0 min: 5 % B, 8 min 100 % B, 8,1 min 100 % B, 8,5 min 5% B, 10 min 5% B.

[0704] RT (min): 2.59; Pureza (máx.): 98,2 %; M+H= 771,40,

PASO 2:

[0705] A una solución de compuesto **35** (175,00 mg; 0,23 mmol; 1,00 eq.) en DCM (1,75 ml), se añadió ácido trifluoroacético (0,18 ml; 2,27 mmol; 10,00 eq.) gota a gota y se agitó durante la noche a RT. La reacción fue monitoreada por CCM. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar el residuo crudo, que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice utilizando metanol al 10% y DCM para proporcionar **Ejemplo 26** (21,4 mg; 0,04 mmol; 17,5%; producto purificado)

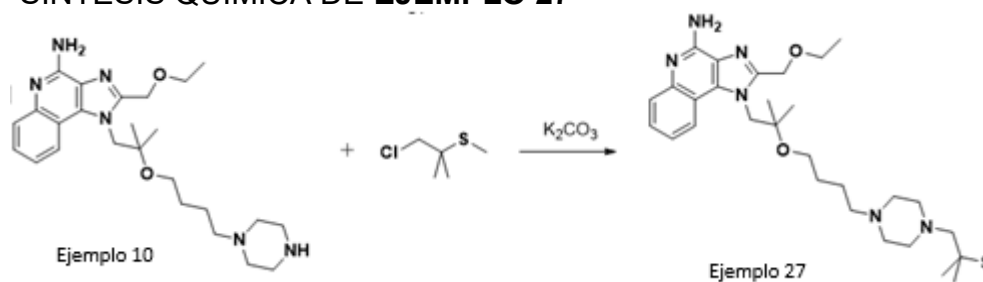
[0706] Rendimiento: 21,4 mg (0,04 mmol), % de rendimiento: 17,5.

[0707] Datos analíticos:

[0708] HPLC: Columna: XBridge C8, 3,5 μ m, 4,6 x 50 mm; Disolvente A: agua + 0,1 % TFA; Disolvente B: ACN + 0,1 % TFA; Fluir: 2 ml/min; Gradiente: 0 min: 5 % B, 8 min 100 % B, 8,1 min 100 % B, 8,5 min 5% B, 10 min 5% B.

[0709] RT (min): 1,96; Pureza (máx.): 97,4 %; M+H= 529,20,

[0710] $^1\text{RMN-H}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8,58 (d, J = 8,00 Hz, 1H), 7,81 (d, J = 7,60 Hz, 1H), 7,71 (t, J = 15,60 Hz, 1H), 7,54 (t, J = 15,60 Hz, 1H), 5,03 (s, br, 3H), 4,70 (s, br, 3H), 3,55-3,57 (m, 15H), 3,20 (s, br, 4H), 2,51-2,52 (m, 3H), 2,11 (s, 3H), 1,14-1,22 (m, 9H).

SÍNTESIS QUÍMICA DE **EJEMPLO 27**

[0711] A una solución del Ejemplo 10 (100,00 mg; 0,22 mmol; 1,00 eq.) disuelta en acetonitrilo (2,00 ml) se le añadió 1-cloro-2-metil-2-(metilsulfanil)propano (91,50 mg; 0,66 mmol; 3,00 eq.) y carbonato de potasio (46,53 mg; 0,33 mmol; 1,50 eq.) y se agitó a 50° C durante la noche. La reacción fue monitoreada por CCM. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua y la capa orgánica se secó con sulfato de sodio, se filtró y se redujo a presión para obtener el residuo crudo. El residuo bruto se purificó mediante el uso de HPLC preparatoria utilizando AGT al 0,1% en agua y ACN para proporcionar **Ejemplo 27** (5,80 mg; 0,01 mmol; 4,7 %; producto purificado).

[0712] Rendimiento: 5,80 mg (0,01 mmol), % de rendimiento: 4,7.

[0713] Datos analíticos:

[0714] COLUMNA CL-EM: ATLANTIS dC18 (50x4,6 mm) 5 µm; Fase móvil: A 0,1% HCOOH en H₂O: ACN (95: 5), B: Tasa de flujo ACN: 1,5 ml / min.

[0715] RT (min): 2.00; Pureza (máx.): 99,48%; M+H: 557,40.

6.2. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL AGONISTA TLR7

6.2.1 ENSAYOS DE REPORTEROS TLR7/8

MATERIAL Y PROCEDIMIENTO GENERAL

[0716] Las líneas celulares HEK-Blue™ TLR7 y TLR8 se obtuvieron de InvivoGen (San Diego, CA, EE. UU.). Las células HEK-Blue se cultivaron en medio DMEM hi glucosa (Gibco-10569010) suplementado con 10% de HI-FBS (origen Aus) (Gibco-10100-147), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco-15140-122-100ml) según las recomendaciones del fabricante. Además, se añadieron mezclas específicas de

antibióticos al cultivo. 100 µg/ml Zeocin (11006-33-0), 10 µg/ml Blastidina (ant-bl-05), 50µg/ml Normocin (ANT-NR-1-500MG) para HEK-Blue™ hTLR7 y 100 µg/ml Zeocin, 30 µg/ml Blastidina, 50µg/ml Normocin para células HEK-Blue™ hTLR8 (todas de InvivoGen).

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL CRIBADO DE AGONISTAS IN VITRO

[0717] Todos los compuestos fueron preparados en DMSO 100% (Sigma-D2650). Los compuestos se diluyeron en serie en DMSO al 100% (3 veces) hasta una curva de respuesta a la dosis de 10 puntos a partir de 30 µM; La concentración final de DMSO en la placa fue del 0,3%. Se utilizaron como controles Resiquimod y TL8-506 (InvivoGen-tlr-tl8506) . Se utilizaron DMSO al 0,3% y Resiquimod 10 µM como mínimo y máximo respectivamente, y el porcentaje de activación se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Activación: } \{100 - (\text{absorbancia máxima} - \text{absorbancia}) / (\text{absorbancia máxima} - \text{absorbancia mínima})\} \times 100.$$

[0718] Para la estimulación con agonistas TLR7/8, las células se resuspendieron en medios completos y se sembraron 40 µl de suspensión celular (10.000 células/pocillo) el día 1 en una placa de ensayo de 384 pocillos (Thermo Scientific™ Nunc – 164688) con compuestos predispensados con el manipulador Echo Liquid. La placa se hizo girar a 100 g durante 1 minuto para que se asentaran las células y se incubó a 37 °C con 5% de CO₂ durante 24 horas. Para medir la producción de SEAP después de 24 horas de incubación, se añadieron 10 µl de solución de Quanti-Blue™ (InvivoGen rep-qbs2) preparada según las instrucciones del fabricante en la placa de ensayo y se incubó a 37 °C con 5% de CO₂ durante 30 min. Después de la incubación, la absorbancia se midió a 620 nm en Chispa Tecan (Spark control Magellan).

[0719] Las EC₅₀ se determinaron utilizando el software estadístico Graph

Pad Prism (versión 7.05), con puntos de datos individuales que representan los valores de absorbancia de los duplicados. En el cuadro 1 se describen los compuestos de la divulgación con un valor de EC₅₀ inferior a 0,01 µM como actividad "A", entre 0,01 µM y 0,1 µM como actividad "B", entre 0,1 µM y 1 µM como actividad "C", entre 1 µM y 10 µM como actividad "D" y más de 10 µM como actividad "E".

TABLA 1: *IN VITRO* CRIBADO DE LOS AGONISTAS DE TLR7/8 EN LAS CÉLULAS DE HEKBlue

Compuesto #	TLR7 EC ₅₀ [µM]	TLR8 EC ₅₀ [µM]
Parámetro 1	C	C
Parámetro 2	E	E
Parámetro 3	D	E
Parámetro 4	D	E
Parámetro 5	C	E
Parámetro 6	B	B
Parámetro 7	B	D
Ejemplo 1	A	D
Ejemplo 2	B	D
Ejemplo 3	A	D
Ejemplo 4	A	C
Ejemplo 5	A	C
Ejemplo 6	B	D
Ejemplo 7	B	C
Ejemplo 8	B	D
Ejemplo 9	B	C
Ejemplo 10	B	D
Ejemplo 11	C	D
Ejemplo 12	B	D
Ejemplo 13	B	E
Ejemplo 14	B	D
Ejemplo 15	B	D
Ejemplo 16	C	D
Ejemplo 17	C	C

Ejemplo 18	D	E
Ejemplo 19	C	B
Ejemplo 20	E	E
Ejemplo 21	C	E
Ejemplo 22	C	E
Ejemplo 23	C	E
Ejemplo 24	C	C
Ejemplo 25	D	E
Ejemplo 26	C	D
Ejemplo 27	B	D

[0720] En general, la mayoría de nuestros ejemplos tienen una potencia mucho mayor en el TLR7 que en los benchmarks. Por otra parte, nuestros ejemplos

6.2.2 SECRECIÓN DE TNFA DE LAS PBMC

MATERIAL Y PROCEDIMIENTO GENERAL

[0721] Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) se aislaron de voluntarios humanos sanos y se almacenaron en nitrógeno líquido. El vial de PBMC congelado se descongeló en un baño de agua a 37 °C durante no más de 2 minutos. El contenido del tubo se transfirió asépticamente a un medio completo precalentado que contenía medio basal RPMI (Gibco-21875034) suplementado con 10% de HI-FBS (origen Aus) (Gibco-10100-147) y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco-15140-122-100ml) seguido de centrifugación. Las células se resuspendieron en medios completos (3 ml) y se contaron con hemocitómetro

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL CRIBADO DE AGONISTAS IN VITRO

[0722] Todos los compuestos seleccionados (cinco moléculas de referencia y 15 moléculas de ejemplo) se prepararon en DMSO 100% (Sigma-D2650) (stock de 10 mM). Los compuestos se diluyeron en serie en DMSO al 100% (4 veces) hasta 8

puntos de DRC en una placa de 96 pocillos con fondo en U (Cellstar-650180). 3 μ l de este DRC diluido en serie se mezclaron con 97 μ l de medios terminados (1:33,33) como dilución intermedia (300 μ M) 3% DMSO. Se añadieron 11 μ l de compuestos de dilución intermedia a la placa de PBMC (1:10), de modo que la concentración final de DMSO en la placa de cultivo es del 0,3% y la concentración inicial de los compuestos es de 30 μ M. Se utilizaron resiquimod (30 μ M) y DMSO (0,3%) como controles positivos y negativos, respectivamente.

[0723] La placa se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 18 horas. Después de la incubación, la placa se hizo girar a 2000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se aspiró suavemente y se recolectó en placas de 96 pocillos de fondo en V de baja unión a proteínas (Thermo Fisher-249944). Las placas sobrenadantes se sellaron, se etiquetaron adecuadamente y se almacenaron a -80°C hasta el análisis de citocinas (<1 mes).

[0724] Se utilizó el kit de panel de perlas magnéticas de citocinas/quimiocinas humanas MILLIPLEX MAP (HCYTOMAG-60K) para medir el TNF alfa según la recomendación del kit.

[0725] Las EC₅₀ se determinaron utilizando el software estadístico Graph Pad Prism (versión 7.05), con puntos de datos individuales que representan los valores de absorbancia de los duplicados. En el cuadro 2 se describen los compuestos de la divulgación con un valor EC₅₀ inferior a 0,1 μ M como actividad "A", entre 0,1 μ M y 1 μ M como actividad "B", entre 1 μ M y 10 μ M como actividad "C" y más de 10 μ M como actividad "D".

TABLA 1: *In vitro* CRIBADO DE AGONISTAS TLR7/8 SELECCIONADOS EN PBMC

Compuesto #	TNF α EC ₅₀ [μ M]
Parámetro 1	C
Parámetro 2	D
Parámetro 3	C

Parámetro 5	C
Parámetro 7	D
Ejemplo 2	B
Ejemplo 3	A
Ejemplo 4	A
Ejemplo 7	B
Ejemplo 8	C
Ejemplo 9	D
Ejemplo 10	B
Ejemplo 11	C
Ejemplo 13	B
Ejemplo 14	B
Ejemplo 18	C
Ejemplo 19	A
Ejemplo 27	C

6.2.3 EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE ACTIVACIÓN CD86 EN PBMC

MATERIAL Y PROCEDIMIENTO GENERAL

[0726] Los PBMC se adquirieron comercialmente de HemaCare Corporation y se cultivaron en RPMI (Gibco-11875093) que contenía un 10% de HI-FBS. Para la estimulación, se sembraron 50 µl de suspensión celular que contenía 2×10^5 células en la tapa blanca de fondo plano de la placa de ensayo de 96 pocillos (Greiner Bio one – 655180). Los agonistas fueron examinados con PBMC recién cultivados. Para la tinción con citometría de flujo se utilizaron los anticuerpos FITC anti-humano CD14 (Bioscience, 11-0149-42), PE anti-humano CD123 (Biolegend, 396704), BV421 anti-humano CD11c (Biolegend 301628) y APC anti-humano CD86 (Biolegend, 374208).

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA PRUEBA DE AGONISTAS IN VITRO

[0727] Todos los compuestos se elaboraron a una concentración 2 veces mayor para producir un stock intermedio (2 µM) utilizando medios de cultivo. Los

compuestos se diluyeron en serie en medios de cultivo utilizando una dilución de 10 veces para un total de DRC de 4 puntos (2-0,002 μ M). El material intermedio (50 μ l) y el material diluido en serie se añadieron a la placa de ensayo para obtener una concentración final de 1-0,001 μ M. Se utilizaron células no estimuladas o estimuladas con DMSO al 0,02% como control. La placa se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 21 horas.

[0728] Al día siguiente, las células se recolectaron utilizando tampón FACS helado (DPBS sin cationes y que contenía 2% de HI-FBS) y se transfirieron a una placa inferior en V de 96 pocillos separada (Greiner, 650201). Las celdas se lavaron una vez con tampón FACS girando a 1400 rpm durante 2 minutos a 4 °C. Se realizó un lavado posterior en PBS seguido de una tinción de vivos y muertos de las células utilizando una tinción amarilla zombie (Biolegend, 423103; 1:100) diluida en PBS según el protocolo del fabricante. Las células se lavaron dos veces en tampón FACS y se tiñeron con anticuerpos anti-CD14 FITC, anti-CD11c BV421, anti-CD123 PE y anti-CD86 APC (2 μ l/prueba de cada anticuerpo) en tampón FACS durante 1 hora a 4 °C en condiciones de oscuridad. Después de la tinción, las células se lavaron dos veces con tampón FACS a 1400 rpm durante 2 minutos a 4 °C. Las células suspendidas en tampón FACS (100 μ l/pocillo) se analizaron utilizando el citómetro de flujo ACEA NovoCyte después de establecer una matriz de compensación utilizando perlas de compensación, excepto para la tinción de vivos-muertos para la que se utilizaron las PBMCs teñidas con colorante amarillo zombie.

[0729] Las PBMC se comprobaron con FSC-H y SSC-H, que a su vez se comandaron aún más para células individuales con FSC-H y FSC-A. Los singletes fueron compuertas para su viabilidad utilizando una mancha de muertos vivos capturada en el canal de color naranja del Pacífico. Los singletes viables se seleccionaron para la población CD14+ (monocitos), CD14-CD11c+ (población cDC) y CD14-CD11c-CD123+ (pDC). Cada población fue evaluada adicionalmente para la

expresión de CD86+ en el canal respectivo. Las puertas negativa y positiva se asignaron utilizando el control FMO respectivo utilizando el software NovoExpress. Se generó un diagrama de dispersión X-Y para cada estimulante mediante el trazado de la concentración frente a la mediana de la intensidad de fluorescencia de la tinción de CD86 dentro de la población de cDC (Figura 4A) y la población de pDC (Figura 4B) y los monocitos (Figura 4C) utilizando el software Graph Pad Prism9.