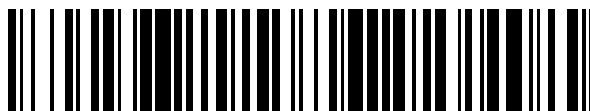


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 458 355**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/095** (2006.01)

**C07D 487/04** (2006.01)

**C07D 471/04** (2006.01)

**C07D 239/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2011 E 11767839 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 2480253**

54 Título: **Adsorción de inmunopotenciadores sobre sales metálicas insolubles**

30 Prioridad:

**23.03.2011 US 201161466887 P**

**02.03.2011 US 201161448394 P**

**01.09.2010 US 379126 P**

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

**05.05.2014**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (50.0%)**

**Lichtstrasse 35**

**4056 Basel, CH y**

**IRM LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SINGH, MANMOHAN;**

**SKIBINSKI, DAVID A.G.;**

**WU, TOM YAO-HSIANG;**

**LI, YONGKAI;**

**CORTEZ, ALEX;**

**ZHANG, XIAOYUE;**

**ZOU, YEFEN;**

**HOFFMAN, TIMOTHY Z.;**

**PAN, JIANFENG y**

**YUE, KATHY**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 458 355 T3**

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

**Adsorción de inmunopotenciadores sobre sales metálicas insolubles****Descripción****5 CAMPO TÉCNICO**

La invención pertenece al campo de la formulación de compuestos inmunopotenciadores para su uso *in vivo*. Más concretamente, la invención se refiere al diseño de agentes inmunopotenciadores para la formulación por asociación con sales metálicas insolubles, por ejemplo, mediante adsorción.

10

**TÉCNICA ANTERIOR**

La detección temprana de clases específicas de patógenos se logra mediante el sistema inmunitario innato con la ayuda de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Los patógenos detectados incluyen virus, bacterias, protozoos y hongos, y cada uno expresa constitutivamente un conjunto de moléculas resistentes a la mutación específicas de clase llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP).

15

Los receptores tipo Toll (TLR) son una importante familia de PRR y se expresan ampliamente en las células inmunitarias innatas, incluidas las células dendríticas (DC), los macrófagos, los mastocitos, los neutrófilos, las células endoteliales y los fibroblastos. Los TLR tienen una amplia especificidad para los patrones moleculares conservados compartidos por bacterias, virus y parásitos.

20

Se han caracterizado varios TLR diferentes. Estos TLR se unen a y son activados por diferentes ligandos, que a su vez se encuentran en diferentes organismos o estructuras. Es de interés en la técnica el desarrollo de compuestos inmunopotenciadores que sean capaces de provocar respuestas en TLR específicos.

25

Por ejemplo, en la referencia 1 se describen determinadas moléculas lipopeptídicas que son agonistas de TLR2. En cada una de las referencias 2 a 5 se describen clases de agonistas de TLR7 de molécula pequeña. En las referencias 6 y 7 se describen agonistas de TLR7 y TLR8 para el tratamiento de enfermedades. Estos diversos compuestos incluyen inmunopotenciadores de molécula pequeña (SMIP).

30

Por lo general estos compuestos se han seleccionados por su actividad moduladora de TLR, sin prestar atención a sus propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas (PK/PD) o por su retención en un sitio de la inyección en el que pueden ejercer de manera provechosa un efecto inmunoestimulador. Por lo tanto, los compuestos pueden tener perfiles de retención o PK/PD bajos cuando se introduce *in vivo*. Por otra parte, puede ser deseable modificar la exposición sistémica de los compuestos, por ejemplo para minimizar los posibles efectos secundarios sistémicos en las vacunaciones profilácticas generalizadas o para mantener la exposición sistémica en una situación inmunoterapéutica de emergencia. Como se muestra en las figuras 1 a 5, la inyección de un SMIP con actividad TLR7 en un sujeto da como resultado inicialmente una alta concentración sérica que disminuye rápidamente, y los compuestos inyectados pueden eliminarse completamente del músculo en 24 horas.

35

40

Es un objeto de la invención proporcionar nuevas formulaciones de inmunopotenciadores, y en particular de SMIP, que puedan modificar o mejorar las propiedades farmacológicas de los inmunopotenciadores, tales como los perfiles de PK/PD, la captación celular, la retención en los sitios de inyección, una reducida activación general de los linfocitos B, etc. Es un objeto adicional proporcionar formulaciones que puedan mejorar su actividad inmunoestimuladora.

45

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Los autores de la invención han descubierto sorprendentemente que la PK/PD de los inmunopotenciadores (y, en particular los agonistas de TLR), y su retención en los sitios de inyección, pueden modificarse adsorbiéndolos a sales metálicas insolubles, tales como sales de aluminio. Lo ideal es que la adsorción estable de los compuestos tenga lugar por intercambio de ligandos, pero los SMIP conocidos carecen por lo general de grupos funcionales adecuados. Por lo tanto, pueden modificarse los SMIP para introducir un resto adsorbente, tal como un grupo fosfonato, que a continuación puede intervenir en la adsorción. Los autores de la invención han descubierto que estos SMIP modificados (en particular, los agonistas de TLR7) pueden conservar su actividad inmunitaria *in vivo* incluso cuando se administran en forma adsorbida, y así las propiedades PK/PD mejoradas no son a expensas de la actividad inmunoestimuladora. De hecho, en el presente documento se demuestra que la adsorción de los agonistas de TLR7 mejora su actividad inmunoestimuladora. Además, la adsorción de los compuestos puede reducir las concentraciones séricas máximas y aumentar los tiempos de residencia en los sitios de inyección intramuscular, lo que puede contribuir a modificar y controlar el nivel de exposición sistémica. Una exposición sistémica alta puede provocar la producción de altos niveles de citocinas proinflamatorias en sangre, por lo que un mayor tiempo de residencia en un sitio de la inyección puede ayudar a minimizar la producción de citocinas proinflamatorias en sangre, mejorando así la seguridad y/o la tolerabilidad de los compuestos. La captación celular de los compuestos también puede potenciarse mediante la adsorción.

50

55

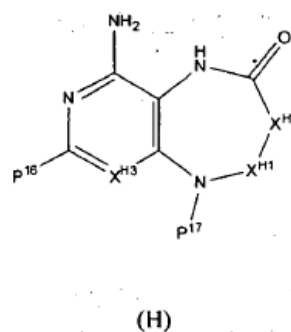
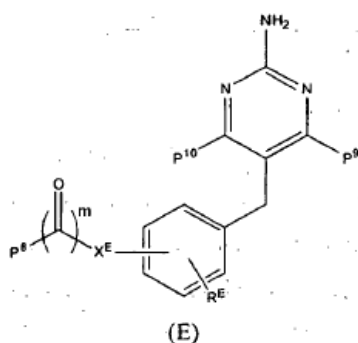
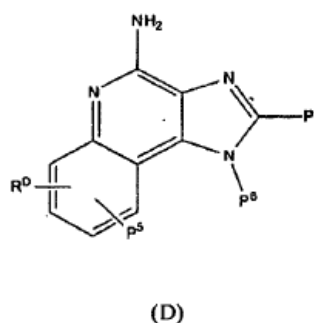
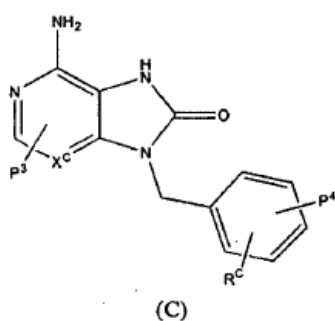
60

65

La invención permite modificar los SMIP para que contengan al menos un resto adsorbente de manera que el SMIP modificado tenga la capacidad de adsorberse a adyuvantes de sales metálicas insolubles. Los autores de la invención se han dado cuenta de la amplia aplicabilidad de esta modificación y la posterior formulación para los agentes inmunopotenciadores en su conjunto. Por lo tanto, en el presente documento se describen una gran variedad de compuestos inmunopotenciadores funcionalizados y composiciones que comprenden estos compuestos funcionalizados que son ilustrativas de la presente invención.

La presencia del resto adsorbente permite que el agonista de TLR sea formulado con un adyuvante de sal metálica insoluble con el fin de modificar o mejorar su perfil farmacocinético y farmacodinámico, para aumentar la duración de su retención en un sitio de la inyección intramuscular y/o para aumentar su efecto inmunoestimulador.

En un primer aspecto, la invención proporciona un agonista de TLR7 seleccionado de entre los compuestos según cualquiera de fórmulas (C), (D), (E) y (H):



en las que:

(a) P<sup>3</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, CF<sub>3</sub> y -((CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>O)<sub>q</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>O<sub>s</sub>- e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>); y P<sup>4</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>); a condición de que al menos uno de entre P<sup>3</sup> y P<sup>4</sup> sea -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>),

(b) P<sup>5</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>); P<sup>6</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados de entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> y OH, e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>); y P<sup>7</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -((CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>O)<sub>q</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>O<sub>s</sub>-7 -NH alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>); a condición de que al menos uno de entre P<sup>5</sup>, P<sup>6</sup> y P<sup>7</sup> sea -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>);

(c) P<sup>8</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -NH alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cada uno opcionalmente sustituido con OH, e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>); y cada uno de P<sup>9</sup> y P<sup>10</sup> está seleccionado independientemente de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -NH alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cada uno opcionalmente sustituido con OH y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>); a condición de que al menos uno de entre P<sup>8</sup>, P<sup>9</sup> o P<sup>10</sup> sea -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>);

(d) P<sup>16</sup> y cada P<sup>18</sup> está cada uno seleccionado independientemente de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>); P<sup>17</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, heteroarilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> heteroarilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>) e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>), cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 2 sustituyentes seleccionados de entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o heterociclilo, a condición de que al menos uno de entre P<sup>16</sup>, P<sup>17</sup> o un P<sup>18</sup> contenga un resto -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>);

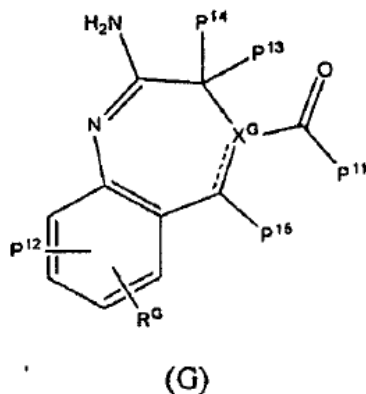
R<sup>X</sup> y R<sup>Y</sup> están seleccionados independientemente de entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

R<sup>C</sup>, R<sup>D</sup> y R<sup>H</sup> está seleccionado independientemente de entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

X<sup>C</sup> está seleccionado de entre CH y N;

$R^E$  está seleccionado de entre H, alquilo  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$ ,  $C(O)$ alquilo  $C_1-C_6$ , halógeno y  $-((CH_2)_pO)_q(CH_2)_p-$ ;  
 $X^E$  está seleccionado de entre un enlace covalente,  $CR^{E2}R^{E3}$  y  $NR^{E4}$ ;  
 $R^{E2}$ ,  $R^{E3}$  y  $R^{E4}$  están seleccionados independientemente de entre H y alquilo  $C_1-C_6$ ;  
 $X^{H1}-X^{H2}$  está seleccionado de entre  $-CR^{H2}R^{H3}$ ,  $-CR^{H2}R^{H3}-CR^{H2}R^{H3}$ ,  $-C(O)CR^{H2}R^{H3}$ ,  $-C(O)CR^{H2}R^{H3}$ ,  $-CR^{H2}R^{H1}C(O)-$ ,  
 $-NR^{H4}C(O)-$ ,  $C(O)NR^{H4}$ ,  $CR^{H2}R^{H3}S(O)_2$  y  $-CR^{H2}=CR^{H2}-$ ;  
Cada uno de  $R^{H2}$ ,  $R^{H3}$  y  $R^{H4}$  está seleccionado independientemente de entre H, alquilo  $C_1-C_6$  y  $P^{18}$ ;  
 $X^{H3}$  está seleccionado de entre N y CN;  
X está seleccionado de entre un enlace covalente, O y NH;  
Y está seleccionado de entre un enlace covalente, O, C(O), S y NH;  
L está seleccionado de entre un enlace covalente alquilenilo  $C_1-C_6$ , alquilenilo  $C_1-C_6$ , arileno, heteroarileno,  
alquilenoxi  $C_1-C_6$  y  $-((CH_2)_pO)_q(CH_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados  
independientemente de entre halo, OH, alquilo  $C_1-C_4$ ,  $-OP(O)(OH)_2$  y  $-P(O)(OH)_2$ ;  
m está seleccionado de entre 0 ó 1;  
cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2, 3, 4, 5 y 6;  
q está seleccionado de entre 1, 2, 3 y 4; y  
s está seleccionado de entre 0 y 1.

Según un segundo aspecto, la invención proporciona un agonista de TLR8 seleccionado de entre los compuestos según la fórmula (G):



en la que:

$P^{11}$  está seleccionado de entre H, alquilo  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$ ,  $-NR^V R^W$  e  $-Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y)$ ;  
 $P^{12}$  está seleccionado de entre H, alquilo  $C_1-C_6$ , arilo opcionalmente sustituido por  $-C(O)NR^V R^W$ , e  
 $-Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y)$ ;  
 $P^{13}$ ,  $P^{14}$  y  $P^{15}$  están seleccionados independientemente de entre H, alquilo  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$  e  
 $-Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y)$ ;  
a condición de que al menos uno de entre  $P^{11}$ ,  $P^{12}$ ,  $P^{13}$ ,  $P^{14}$  o  $P^{15}$  sea  $-Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y)$ ;  
 $R^V$  y  $R^W$  están seleccionados independientemente de entre H, alquilo  $C_1-C_6$  o junto con el átomo de nitrógeno  
al que están fijados forman un anillo heterocíclico de 4 a 7 miembros;  
 $X^G$  está seleccionado de entre C, CH y N;  
----- Representa un doble enlace opcional, en el que  $X^G$  es C si ----- es un doble enlace; y  
 $R^G$  está seleccionado de entre H y alquilo  $C_1-C_6$ ;  
X está seleccionado de entre un enlace covalente, O y NH;  
Y está seleccionado de entre un enlace covalente, O, C(O), S y NH;  
L está seleccionado de entre un enlace covalente alquilenilo  $C_1-C_6$ , alquilenilo  $C_1-C_6$ , arileno, heteroarileno,  
alquilenoxi  $C_1-C_6$  y  $-((CH_2)_pO)_q(CH_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes  
seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo  $C_1-C_4$ ,  $-OP(O)(OH)_2$  y  $-P(O)(OH)_2$ ;  
cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2, 3, 4, 5 y 6; y  
q está seleccionado de entre 1, 2, 3 y 4.

El segundo aspecto incluye tales agonistas de fórmula (G) adsorbidos a una sal metálica insoluble. Por lo tanto, la invención proporciona una composición que comprende el compuesto agonista y una sal metálica insoluble, en la que el compuesto agonista está adsorbido sobre la sal metálica insoluble.

La presente descripción proporciona un proceso para preparar un complejo adyuvante, que comprende una etapa de mezclar un agonista de TLR con una sal metálica insoluble de manera que el agonista de TLR se adsorba

a la sal metálica insoluble para formar el complejo. El agonista de TLR es preferentemente un agonista de TLR como se ha descrito anteriormente de diversas maneras. La descripción también proporciona un complejo adyuvante obtenido o que puede obtenerse mediante este proceso. El complejo puede mezclarse con un inmunógeno para proporcionar una composición inmunogénica.

5 En la presente descripción también se proporciona un proceso para preparar un complejo adyuvante estéril, que comprende las etapas de: (i) mezclar un agonista de TLR con una sal metálica insoluble de manera que el agonista de TLR se adsorba a la sal metálica insoluble para formar el complejo, y (ii) esterilizar el complejo. El agonista es preferentemente un agonista como se ha descrito anteriormente de diversas maneras. La descripción también proporciona un complejo adyuvante estéril obtenido o que puede obtenerse mediante este proceso. El complejo estéril puede mezclarse con un inmunógeno para proporcionar una composición inmunogénica. La esterilización puede conseguirse de manera práctica mediante esterilización en autoclave (o procedimientos similares [8]).

10 La descripción también proporciona un proceso para preparar un complejo adyuvante estéril, que comprende las etapas de: (i) esterilizar una solución o suspensión de un agonista de TLR, y (ii) combinar la solución o suspensión esterilizada con una sal metálica insoluble estéril. La descripción también proporciona un proceso para preparar un complejo adyuvante estéril, que comprende las etapas de: (i) esterilizar una sal metálica insoluble, y (ii) combinar la sal metálica insoluble esterilizada con una solución o suspensión estéril de un agonista de TLR. La descripción también proporciona un proceso para preparar un complejo adyuvante estéril, que comprende una etapa de combinar una solución o suspensión estéril de un agonista de TLR con una sal metálica insoluble estéril. La esterilización de la solución/suspensión de agonista de TLR puede conseguirse de manera práctica mediante filtración estéril, y este material puede prepararse en forma concentrada. La esterilización de la sal metálica insoluble puede conseguirse de manera práctica mediante esterilización en autoclave. La sal metálica insoluble estéril será por lo general una suspensión acuosa.

25 La presente descripción también proporciona un proceso para preparar una composición inmunogénica, en el que el proceso comprende mezclar un agonista de TLR, una sal metálica insoluble y un inmunógeno, proporcionando de este modo la composición inmunogénica. La descripción también proporciona una composición inmunogénica obtenida o que puede obtenerse mediante este proceso. En algunas formas de realización, el agonista de TLR no es el compuesto 13 del presente documento. En algunas formas de realización, el inmunógeno no es una mezcla de tres proteínas de 287-953, 936-741 y 961c como se describe en las referencias 40 y 73.

30 La descripción también proporciona un proceso para preparar una composición inmunogénica, que comprende uno de entre: (i) combinar un inmunógeno con una mezcla que comprende un agonista de TLR y una sal metálica insoluble, (ii) combinar una sal metálica insoluble con una mezcla que comprende un agonista de TLR y un inmunógeno, o (iii) combinar un agonista de TLR con una mezcla que comprende una sal metálica insoluble y un inmunógeno. La descripción también proporciona una composición inmunogénica obtenida o que puede obtenerse mediante este proceso. En algunas formas de realización, el agonista de TLR no es el compuesto 13 del presente documento. En algunas formas de realización, el inmunógeno no es una mezcla de tres proteínas de 287-953, 936-741 y 961c como se describe en las referencias 40 y 73.

35 La descripción también proporciona un método para modificar o mejorar el perfil farmacocinético de un inmunopotenciador y/o para aumentar el tiempo durante el que un inmunopotenciador es retenido en un sitio de la inyección intramuscular, comprendiendo el método: modificar químicamente el inmunopotenciador para formar un inmunopotenciador modificado introduciendo un grupo adsorbente. El grupo adsorbente puede unirse al inmunopotenciador a través de un grupo conector (por ejemplo, seleccionado de entre alquileo  $C_1-C_6$ , alquenileno  $C_1-C_6$ , arileno, heteroarileno, alquilenoxi  $C_1-C_6$  y  $-(CH_2)_pO)_q(CH_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo  $C_1-C_4$ ,  $-OP(O)(OH)_2$  y  $-P(O)(OH)_2$ , etc.). El compuesto modificado puede adsorberse a una sal metálica insoluble. Por lo tanto, el método puede comprender adicionalmente: adsorber el inmunopotenciador modificado a una sal metálica insoluble. Esta adsorción puede modificar o mejorar el perfil farmacocinético del inmunopotenciador modificado y/o puede aumentar el tiempo durante el que es retenido en un sitio de la inyección intramuscular, con respecto al inmunopotenciador sin modificar. El método puede comprender adicionalmente una etapa de combinar un inmunopotenciador adsorbente modificado con un inmunógeno, por ejemplo para proporcionar una composición de vacuna.

40 La presente descripción también proporciona una composición que comprende: (a) un complejo adyuvante que comprende un agonista de TLR adsorbido a una sal metálica insoluble, y (b) al menos dos inmunógenos diferentes. El agonista de TLR es preferentemente un agonista de TLR como se ha descrito anteriormente de diversas maneras. En algunas formas de realización, el agonista de TLR no es el compuesto 13 del presente documento. En algunas formas de realización, el inmunógeno no es una mezcla de tres proteínas de 287-953, 936-741 y 961c como se describe en las referencias 40 y 73. La descripción también proporciona un proceso para preparar una composición inmunogénica, que comprende uno de entre: (i) combinar al menos dos inmunógenos diferentes con una mezcla que comprende un agonista de TLR y una sal metálica insoluble, (ii) combinar una sal metálica insoluble con una mezcla que comprende un agonista de TLR y al menos dos inmunógenos diferentes, (iii) combinar un agonista de TLR con una mezcla que comprende una sal metálica insoluble y al menos dos inmunógenos diferentes, o (iv) combinar en cualquier orden un agonista de TLR, una sal metálica insoluble, un

primer inmunógeno y un segundo inmunógeno.

En la presente descripción también se proporciona una composición que comprende: (a) un complejo adyuvante que comprende un primer agonista de TLR adsorbido a una sal metálica insoluble, y (b) un complejo adyuvante que comprende un segundo agonista de TLR adsorbido a una sal metálica insoluble. La composición también puede incluir uno o más inmunógenos.

La descripción también proporciona un proceso para preparar un complejo adyuvante, que comprende las etapas de (i) preparar una mezcla acuosa de un agonista de TLR y una sal de aluminio soluble, a continuación (ii) añadir una sal que no sea de aluminio a la mezcla acuosa con el fin de formar una sal de aluminio precipitada a la que se adsorbe el agonista de TLR. El agonista de TLR es preferentemente un agonista de TLR como se ha descrito anteriormente de diversas maneras. La descripción también proporciona un complejo adyuvante obtenido o que puede obtenerse mediante este proceso. El complejo puede mezclarse con un inmunógeno para proporcionar una composición inmunogénica.

La descripción también proporciona un proceso para preparar una composición inmunogénica, que comprende una etapa de mezclar (i) una mezcla acuosa de un agonista de TLR y una sal de aluminio soluble con (ii) una mezcla acuosa tamponada de un inmunógeno, en el que la etapa de mezcla hace precipitar una sal de aluminio a la que están adsorbidos el agonista de TLR y el inmunógeno. El agonista de TLR es preferentemente un agonista de TLR como se ha descrito anteriormente de diversas maneras. La descripción también proporciona una composición inmunogénica obtenida o que puede obtenerse mediante este proceso.

En la presente descripción también se proporciona un ensayo para analizar un complejo adyuvante que comprende un agonista de TLR adsorbido a una sal metálica insoluble, que comprende las etapas de: (i) tratar el complejo para desorber el agonista de TLR de la sal metálica insoluble; a continuación (ii) detectar el agonista de TLR desorbido. También se proporcionan diversos otros ensayos (véase más adelante).

La descripción proporciona una composición que comprende un agonista de TLR y un adyuvante de hidroxifosfato de aluminio, en el que al menos el 50% (por ejemplo,  $\geq 60\%$ ,  $\geq 70\%$ ,  $\geq 80\%$ ,  $\geq 85\%$ ,  $\geq 90\%$ ,  $\geq 95\%$ ,  $\geq 98\%$ ,  $\geq 99\%$ .) del agonista de TLR se adsorbe sobre el hidroxifosfato de aluminio, a condición de que el agonista de TLR:

- (a) no sea un agonista de TLR4; y
- (b) no sea un agonista de TLR9.

La descripción también proporciona un método para preparar un complejo adyuvante, que comprende las etapas de mezclar una sal de aluminio insoluble con un complejo de un agonista de TLR y una sal de aluminio insoluble, reduciendo así la relación entre agonista de TLR y aluminio. Después de mezclar, puede incubarse la nueva mezcla para permitir la redistribución del agonista de TLR sobre la sal de aluminio añadida. Este método permite diluir un complejo a granel con una relación SMIP:Al<sup>+++</sup> alta hasta un complejo con una relación SMIP:Al<sup>+++</sup> deseada. El material a granel puede utilizarse como base de varias diluciones, simplificando así la fabricación global de múltiples productos finales diferentes. Lo ideal es que la sal de aluminio insoluble que se añade esté libre de agonistas de TLR, o bien tenga una relación SMIP:Al<sup>+++</sup> diferente a la del resto del material, lo que permite un cambio global en la relación. La sal de aluminio en los dos materiales mezclados es preferentemente la misma sal.

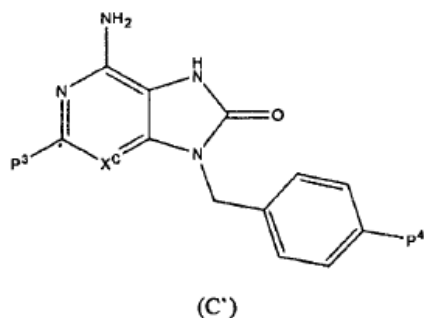
*Fórmulas (C), (D), (E), (G) y (H)*

Como se ha analizado anteriormente, el primer aspecto de la invención proporciona agonistas de TLR7 de fórmulas (C), (D), (E) o (H). El primer aspecto de la invención proporciona compuestos de fórmula (C). El primer aspecto de la invención proporciona también e independientemente compuestos de fórmula (D). El primer aspecto de la invención proporciona también e independientemente compuestos de fórmula (E). El primer aspecto de la invención proporciona también e independientemente compuestos de fórmula (H).

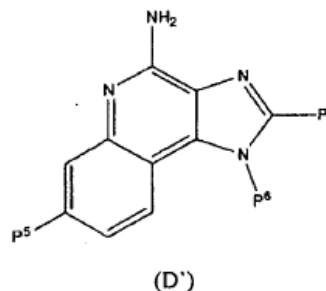
Los compuestos "precursores" de fórmulas (C), (D), (E) y (H) son agonistas TLR7 útiles (véanse las referencias 2-5 y 11-27), pero están modificados en el presente documento por fijación de un resto fosforado. Por lo tanto, los compuestos de fórmulas (C), (D), (E) y (H) pueden utilizarse con diversos aspectos de la invención y la presente descripción.

En algunas formas de realización de fórmulas (C), (D) y (E) los compuestos tienen estructuras según las fórmulas (C'), (D') y (E'), que se muestra a continuación:

5



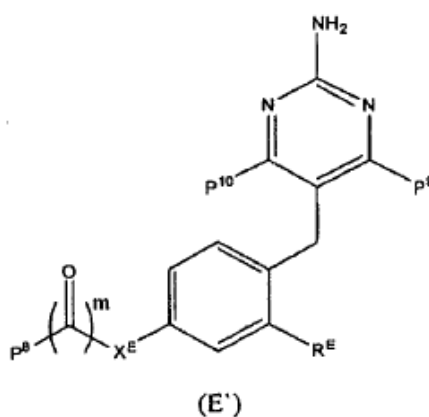
10



15

20

25



30

35

Las formas de realización de la invención de las fórmulas (C), (D), (E) y (H) también se aplican a las fórmulas (C'), (D'), (E') y (H').

40

En algunas formas de realización de fórmulas (C), (D), (E) y (H): X es O; L está seleccionado de entre alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}_q(\text{CH}_2)_p-$  cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  y  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ; cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2 y 3; y q está seleccionado de entre 1 y 2.

45

En otras formas de realización de fórmula (C): P<sup>3</sup> está seleccionado de entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, CF<sub>3</sub> y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}_q(\text{CH}_2)_p\text{O}_s-$  e  $-\text{Y-L-X-P}(\text{O})(\text{OR}^X)(\text{OR}^Y)$ ; P<sup>4</sup> está seleccionado de entre -alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e  $-\text{Y-L-X-P}(\text{O})(\text{OR}^X)(\text{OR}^Y)$ ; X<sup>C</sup> es CH; X es un enlace covalente; L está seleccionado de entre alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}_q(\text{CH}_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  y  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ; cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2 y 3; q es 1 ó 2.

50

En otras formas de realización de fórmulas (C), (D), (E) y (H): X es un enlace covalente; L está seleccionado de entre alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}_q(\text{CH}_2)_p-$  cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  y  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ; cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2 y 3; y q está seleccionado de entre 1 y 2.

55

En otras formas de realización de fórmula (C): P<sup>3</sup> está seleccionado de entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, CF<sub>3</sub> y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}_q(\text{CH}_2)_p\text{O}_s-$  e  $-\text{Y-L-X-P}(\text{O})(\text{OR}^X)(\text{OR}^Y)$ ; P<sup>4</sup> está seleccionado de entre -alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e  $-\text{Y-L-X-P}(\text{O})(\text{OR}^X)(\text{OR}^Y)$ ; X<sup>C</sup> es N; X es un enlace covalente; L está seleccionado de entre alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}_q(\text{CH}_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  y  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ; cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2 y 3; q está seleccionado de entre 1 y 2.

60

En otras formas de realización de fórmula (D): P<sup>5</sup> está seleccionado de entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e  $-\text{Y-L-X-P}(\text{O})(\text{OR}^X)(\text{OR}^Y)$ .

65

En otras formas de realización de fórmula (D): X es O; L está seleccionado de entre alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}_q(\text{CH}_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  y  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ; cada p está seleccionado independientemente de entre

1, 2 y 3; y q está seleccionado de entre 1 y 2.

5 En otras formas de realización de fórmula (D): X es un enlace covalente; L está seleccionado de entre alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}_q(\text{CH}_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  y  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ; cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2 y 3; y q está seleccionado de entre 1 y 2.

10 En otras formas de realización de fórmula (E): X es O; L está seleccionado de entre alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}_q(\text{CH}_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  y  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ; cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2 y 3; y q está seleccionado de entre 1 y 2.

15 En otras formas de realización de fórmula (E): X es un enlace covalente; L está seleccionado de entre alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}_q(\text{CH}_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  y  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ; cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2 y 3; y q está seleccionado de entre 1 y 2.

20 En otras formas de realización de fórmula (E): X<sup>E</sup> es CH<sub>2</sub>, P<sup>8</sup> es alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con  $-\text{Y}-\text{L}-\text{X}-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^X)(\text{OR}^Y)$ .

25 En otras formas de realización de fórmula (E): P<sup>9</sup> es -NH alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con OH y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e  $-\text{Y}-\text{L}-\text{X}-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^X)(\text{OR}^Y)$ .

En algunas formas de realización, un compuesto de fórmula (C) no es un compuesto en el que P<sup>4</sup> es  $-\text{Y}-\text{L}-\text{X}-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^X)(\text{OR}^Y)$ .

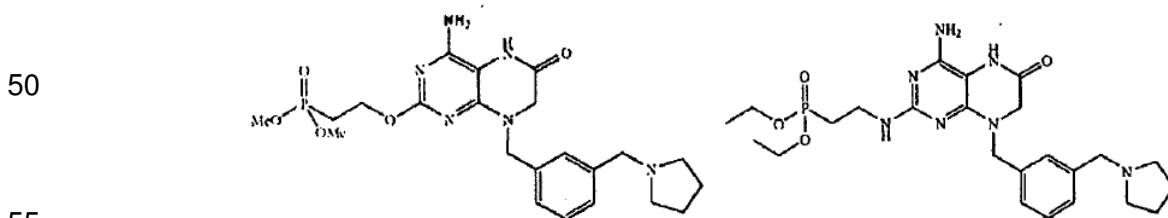
30 En algunas formas de realización, en un compuesto de fórmula (C), P<sup>4</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

Los compuestos preferentes de fórmula (C), (D) y (E) son los compuestos (6), (7), (8), (67), (68), (69) y (70) como se describen más adelante. La invención proporciona cada uno de los compuestos (6), (7), (8), (67), (68), (69) y (70).

35 En algunas formas de realización de fórmula (H): X<sup>H1</sup>-X<sup>H2</sup> es CR<sup>H2</sup>R<sup>H3</sup>, R<sup>H2</sup> y R<sup>H3</sup> son H, X<sup>H3</sup> es N, X es un enlace covalente; L está seleccionado de entre alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}_q(\text{CH}_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  y  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ; cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2 y 3; y q está seleccionado de entre 1 y 2.

40 En algunas formas de realización de fórmula (H): X<sup>H1</sup>-X<sup>H2</sup> es CR<sup>H2</sup>R<sup>H3</sup>, R<sup>H2</sup> y R<sup>H3</sup> son H, X<sup>H3</sup> es N, X es O; L está seleccionado de entre alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}_q(\text{CH}_2)_p-$  cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  y  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ; cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2 y 3; y q está seleccionado de entre 1 y 2.

45 En algunas formas de realización, un agonista de TLR de la invención, por ejemplo, un compuesto de fórmula (H), no es uno de los dos siguientes compuestos;



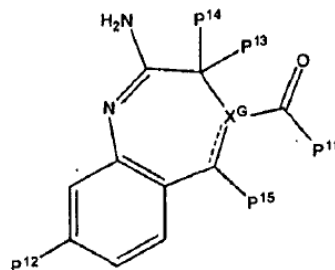
60 Como se ha analizado anteriormente, el segundo aspecto de la invención proporciona compuestos de fórmula (G). Los compuestos "precursores" de fórmula (G) son agonistas de TLR8 útiles (véanse las referencias 6 y 7), pero están modificados en el presente documento mediante fijación de un resto fosforado. Por lo tanto, los compuestos de fórmula (G) pueden utilizarse con diversos aspectos de la invención y la presente descripción.

65 En algunas formas de realización de fórmula (G), los compuestos tienen estructuras según la fórmula (G');



5

10



(G')

15

En algunas formas de realización de fórmula (G) o (G'): X<sup>G</sup> es C y ----- representa un doble enlace.

20

En algunas formas de realización de fórmula (G) o (G'): X es un enlace covalente; L está seleccionado de entre alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y -((CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>O)<sub>q</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-, cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, -OP(O)(OH)<sub>2</sub> y -P(O)(OH)<sub>2</sub>; cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2 y 3; y q está seleccionado de entre 1 y 2.

25

En algunas formas de realización de fórmula (G) o (G'): X es O; L está seleccionado de entre alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y -((CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>O)<sub>q</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>- cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, -OP(O)(OH)<sub>2</sub> y -P(O)(OH)<sub>2</sub>; cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2 y 3; y q está seleccionado de entre 1 y 2.

#### Compuestos útiles con la invención

30

Los agonistas de TLR preferentes son hidrosolubles. Por lo tanto, pueden formar una solución homogénea cuando se mezclan en un tampón acuoso con agua a pH 7 a 25 °C y a 1 atmósfera de presión para dar una solución con una concentración de al menos 50 µg/ml. El término "hidrosoluble" excluye por lo tanto sustancias que sean sólo moderadamente solubles en estas condiciones.

35

Además de ser hidrosolubles a pH 7, los agonistas de TLR hidrosolubles preferentes son hidrosolubles a un pH entre 4 y 10, por ejemplo entre 5 y 9, entre 6 y 8 o preferentemente entre 6,5 y 7,5.

#### Restos adsorbentes

40

Los restos adsorbentes mencionados anteriormente son grupos funcionales que son capaces de adsorberse a una sal metálica insoluble (por ejemplo, a una sal de aluminio insoluble, tal como oxihidróxido de aluminio) por ejemplo, por intercambio de ligando o cualquier otro mecanismo adecuado. Por lo tanto, el resto adsorbente puede dotar a un compuesto activo (por ejemplo, el agonista de TLR) de la capacidad de adsorberse a una sal metálica insoluble.

45

50

El intercambio de ligandos es un mecanismo de adsorción por el que los restos químicos en un compuesto inmunopotenciador se intercambian con restos químicos en la superficie de una sal metálica insoluble, lo que da como resultado la adsorción del inmunopotenciador a la superficie de la sal metálica. Este es el principal mecanismo de adsorción para proteínas fosforiladas tales como HBsAg [28,29]. Por lo tanto un inmunopotenciador puede comprender un resto adsorbente tal como un grupo fosfonato, que puede intercambiarse con grupos en la superficie de la sal, tales como grupos hidroxilo en el oxihidróxido de aluminio. Sin embargo, en algunas formas de realización, la adsorción puede tener lugar mediante cualquier otro mecanismo adecuado, por ejemplo por medios electrostáticos o hidrófobos [30] (o mediante una combinación de mecanismos). En algunas formas de realización, no puede producirse la adsorción fisicoquímica real y un agonista de TLR puede quedar en cambio inmovilizado en los espacios vacíos dentro de los agregados de la sal metálica (por ejemplo, como se ha analizado en la referencia 31), pero esta inmovilización puede ser potenciada por la presencia del grupo adsorbente. En otras formas de realización puede haber una mezcla de agonista de TLR adsorbido e inmovilizado.

55

60

Los restos adsorbentes fosforados resultan especialmente útiles, y por lo tanto un resto adsorbente puede comprender un fosfato, un fosfonato, un fosfinato, un fosfonito, una fosfinito, etc. Un resto adsorbente útil comprende al menos un grupo fosfato. Un resto adsorbente preferente comprende al menos un grupo fosfonato.

65

Un agonista de TLR puede incluir un fosfato (opcionalmente sustituido) o fosfonato (opcionalmente sustituido) mediante el que puede adsorberse a una sal metálica insoluble.

Los grupos fosforados empleados con la invención pueden existir en varias formas protonadas y

desprotonadas dependiendo del pH del ambiente circundante, por ejemplo el pH del disolvente en el que se disuelven. Por lo tanto, aunque puede ilustrarse una forma concreta, se pretende, a menos que se indique lo contrario, que estas ilustraciones sean meramente representativas y no limitativas a una forma protonada o desprotonada específica.

5 Por ejemplo, en el caso de un grupo fosfato, esto se ha ilustrado como  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ , pero la definición incluye las formas protonadas  $-\text{[OP}(\text{O})(\text{OH}_2)(\text{OH})]^+$  y  $-\text{[OP}(\text{O})(\text{OH}_2)_2]^{2+}$  que pueden existir a un pH inferior a 7, y las formas desprotonadas  $-\text{[OP}(\text{O})(\text{OH})(\text{O})]^-$  y  $-\text{[OP}(\text{O})(\text{O})_2]^{2-}$  que pueden existir a un pH superior a 7.

10 Los compuestos descritos en el presente documento pueden existir como sales farmacéuticamente aceptables. Por lo tanto, los compuestos pueden utilizarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, es decir, una sal fisiológicamente o toxicológicamente tolerable (que incluye, cuando proceda, sales de adición de base farmacéuticamente aceptables y sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables).

15 Las alternativas a los grupos funcionales fosforados para proporcionar un agonista de TLR adsorbente son los grupos nitrato y/o sulfato.

Los compuestos útiles con la invención pueden incluir un solo resto adsorbente o pueden incluir más de uno, por ejemplo entre 2 y 15 restos adsorbentes. Por lo general, un compuesto incluirá 1, 2 ó 3 restos adsorbentes.

### 20 **Sales metálicas insolubles**

Como se describe en el presente documento, los inmunopotenciadores pueden adsorberse a sales metálicas insolubles, formando de este modo un complejo adsorbido. Por ejemplo, pueden adsorberse a sales de calcio insolubles (por ejemplo, fosfato de calcio) o, preferentemente, a sales de aluminio insolubles. Tales sales de aluminio tienen una larga historia de uso en vacunas. Las sales de aluminio que incluyen iones de hidróxido son las sales metálicas insolubles preferentes para su uso con la presente invención.

Por lo tanto, la invención proporciona diversas formas de realización en las que un agonista de TLR se adsorbe a tales sales insolubles, por ejemplo un compuesto de fórmula (C), (D), (E), (G) o (H).

Las sales de aluminio útiles incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de aluminio, oxihidróxido de aluminio e hidroxifosfatos de aluminio (incluidos hidroxifosfato sulfato de aluminio). Tales sales se describen, por ejemplo, en los capítulos 8 y 9 de la referencia 32.

Las sales preferentes para la adsorción de inmunopotenciadores son oxihidróxidos de aluminio y/o hidroxifosfato de aluminio. Éstos tienen restos hidroxilo superficiales que pueden experimentar fácilmente intercambio de ligandos con los grupos fosforados (por ejemplo, fosfatos, fosfonatos) para proporcionar una adsorción estable.

Los adyuvantes comúnmente conocidos como "hidróxido de aluminio" son por lo general sales de oxihidróxido de aluminio, que suelen ser al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que puede representarse mediante la fórmula  $\text{AlO}(\text{OH})$ , puede distinguirse de otros compuestos de aluminio, tales como el hidróxido de aluminio  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , mediante espectroscopia de infrarrojos (IR), en particular por la presencia de una banda de adsorción a  $1.070\text{ cm}^{-1}$  y un hombro fuerte a  $3.090\text{--}3.100\text{ cm}^{-1}$  (capítulo 9 de la referencia 32). El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja en la anchura de la banda de difracción a media altura (WHH), mostrando las partículas poco cristalinas un mayor ensanchamiento de la línea debido a unos menores tamaños de cristalita. La superficie de contacto aumenta a medida que aumenta la WHH, y se ha observado que los adyuvantes con mayores valores de WHH tienen mayor capacidad de adsorción de antígeno. Una morfología fibrosa (por ejemplo, como se observa en las micrografías electrónicas de transmisión) es típica de adyuvantes de hidróxido de aluminio, por ejemplo, con partículas aciculares con diámetros de aproximadamente 2 nm. El pl de los adyuvantes de hidróxido de aluminio es por lo general de aproximadamente 11, es decir, el propio adyuvante tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Se han notificado capacidades de adsorción de entre 1,8 mg-2,6 mg de proteína por mg de  $\text{Al}^{+++}$  a pH 7,4 para los adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes comúnmente conocidos como "fosfato de aluminio" son por lo general hidroxifosfatos de aluminio, que con frecuencia también contienen una pequeña cantidad de sulfato (es decir, hidroxifosfato sulfato de aluminio). Pueden obtenerse por precipitación, y las concentraciones y condiciones de reacción durante la precipitación influyen en el grado de sustitución de hidroxilo por fosfato en la sal. Los hidroxifosfatos tienen generalmente una relación molar  $\text{PO}_4/\text{Al}$  entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos pueden distinguirse del  $\text{AlPO}_4$  estricto por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro de IR a  $3.164\text{ cm}^{-1}$  (por ejemplo, cuando se calienta a  $200\text{ }^\circ\text{C}$ ) indica la presencia de hidroxilos estructurales (capítulo 9 de la referencia 32).

La relación molar  $\text{PO}_4/\text{Al}^{3+}$  de un adyuvante de fosfato de aluminio estará generalmente entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2 y más preferentemente  $0,95\pm 0,1$ . El fosfato de aluminio será generalmente amorfo, especialmente para las sales de hidroxifosfato. Un adyuvante típico es el hidroxifosfato de aluminio amorfo con una

relación molar  $\text{PO}_4/\text{Al}$  entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6 mg de  $\text{Al}^{3+}/\text{ml}$ . El fosfato de aluminio será generalmente particulado (por ejemplo, morfología laminar como se observa en las micrografías electrónicas de transmisión, encontrándose las partículas primarias en el intervalo de 50 nm). Los diámetros típicos de las partículas se encuentran en el intervalo de 0,5  $\mu\text{m}$ -20  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ -10  $\mu\text{m}$ ) después de cualquier adsorción de antígeno. Se han notificado capacidades de adsorción de entre 0,7 mg-1,5 mg de proteína por mg de  $\text{Al}^{+++}$  a pH 7,4 para los adyuvantes de fosfato de aluminio.

El punto de carga cero (PZC) del fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución de hidroxilo por fosfato, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y la concentración de los reactivos utilizados para preparar la sal por precipitación. El PZC también se modifica cambiando la concentración de iones fosfato libres en solución (más fosfato = PZC más ácido) o añadiendo un tampón tal como un tampón de histidina (hace el PZC más básico). Los fosfatos de aluminio utilizados según la invención tendrán generalmente un PZC de entre 4,0 y 7,6, más preferentemente entre 5,0 y 6,5 por ejemplo, aproximadamente 5,7.

En solución, los adyuvantes de hidróxido y de fosfato de aluminio tienden a formar agregados porosos estables de 1  $\mu\text{m}$ -10  $\mu\text{m}$  de diámetro [33].

Una composición que incluye un agonista de TLR de la invención adsorbido a una sal metálica también puede incluir un tampón (por ejemplo, un fosfato o una histidina o un tampón Tris). Sin embargo, cuando una composición de este tipo incluye un tampón de fosfato resulta preferente que la concentración de iones fosfato en el tampón sea inferior a 50 mM por ejemplo, < 40 mM, < 30 mM, < 20 mM, < 10 mM o < 5 mM, o entre 1 mM-15 mM.

Debido a la insolubilidad de las sales metálicas adsorbentes que son útiles con la invención, las composiciones que contienen inmunopotenciadores adsorbidos serán generalmente suspensiones de aspecto turbio. Esto puede enmascarar el crecimiento bacteriano contaminante y por lo tanto una composición de la invención puede incluir un conservante tal como tiomersal o 2-fenoxietanol. Resulta preferente que una composición esté prácticamente libre (por ejemplo, < 10 mg/ml) de material mercurial, por ejemplo, libre de tiomersal. Resultan más preferentes las vacunas que no contienen mercurio.

Una composición puede incluir una mezcla de un oxihidróxido de aluminio y un hidroxifosfato de aluminio, y un inmunopotenciador puede adsorberse a una de estas sales o a ambas.

La concentración de  $\text{Al}^{+++}$  en una composición para administrarse a un paciente es preferentemente inferior a 10 mg/ml por ejemplo,  $\leq 5$  mg/ml,  $\leq 4$  mg/ml,  $\leq 3$  mg/ml,  $\leq 2$  mg/ml,  $\leq 1$  mg/ml, etc. Un intervalo preferente de  $\text{Al}^{+++}$  en una composición de la invención está comprendido entre 0,3 mg/ml y 1 mg/ml o entre 0,3 mg/ml-0,5 mg/ml. Resulta preferente un máximo de 0,85 mg/dosis. Dado que la inclusión de un agonista de TLR puede mejorar el efecto adyuvante de las sales de aluminio, la invención permite ventajosamente cantidades menores de  $\text{Al}^{+++}$  por dosis, y por lo tanto una composición de la invención puede incluir de manera provechosa entre 10  $\mu\text{g}$  y 250  $\mu\text{g}$  de  $\text{Al}^{+++}$  por dosis unitaria. Las vacunas pediátricas actuales incluyen por lo general al menos 300  $\mu\text{g}$  de  $\text{Al}^{+++}$ . En términos de concentración, una composición de la invención puede tener una concentración de  $\text{Al}^{+++}$  entre 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , por ejemplo, entre 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , entre 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o entre 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

En general, cuando una composición incluye un agonista de TLR y una sal de aluminio, la relación en peso de agonista respecto a  $\text{Al}^{+++}$  será inferior a 5:1, por ejemplo inferior a 4:1, inferior a 3:1, inferior a 2:1 o inferior a 1:1. Por lo tanto, por ejemplo, con una concentración de  $\text{Al}^{+++}$  de 0,5 mg/ml la concentración máxima de agonista de TLR sería 2,5 mg/ml. Pero pueden utilizarse niveles mayores o menores; es típica una masa menor de agonista de TLR que de  $\text{Al}^{+++}$ , por ejemplo, por dosis, 100  $\mu\text{g}$  de agonista de TLR con 0,2 mg de  $\text{Al}^{+++}$ .

Cuando una composición incluye un agonista de TLR y una sal metálica insoluble, resulta preferente que al menos un 50% (en masa) del inmunopotenciador en la composición esté adsorbido a la sal metálica, por ejemplo,  $\geq 60\%$ ,  $\geq 70\%$ ,  $\geq 80\%$ ,  $\geq 85\%$ ,  $\geq 90\%$ ,  $\geq 92\%$ ,  $\geq 94\%$ ,  $\geq 95\%$ ,  $\geq 96\%$ ,  $\geq 97\%$ ,  $\geq 98\%$ ,  $\geq 99\%$  o incluso el 100%. Es típico un mínimo de un 80% de adsorción, y resulta preferente al menos un 90% o un 95%.

Como se ha analizado anteriormente, como resultado de la adsorción a una sal metálica insoluble puede modificarse el comportamiento *in vivo* de los SMIP. Por lo tanto, un SMIP adsorbido puede presentar un mayor tiempo de residencia (por ejemplo, al menos 2 veces mayor) en el músculo después de la inyección intramuscular, con respecto al mismo SMIP inyectado en forma no adsorbida. Puede producirse cierto aclaramiento, pero permanecerá presente una porción detectable del SMIP inyectado. Por lo tanto, por ejemplo, un SMIP adsorbido, cuando se inyecta por vía intramuscular, puede estar aún presente en el músculo inyectado al menos 12 horas más tarde, por ejemplo, 24 horas más tarde.

En algunas formas de realización, un SMIP adsorbido puede presentar una concentración sérica máxima menor, con respecto al mismo SMIP inyectado en forma no adsorbida. Este máximo suele expresarse como un valor  $C_{\text{max}}$ . Por ejemplo, un SMIP adsorbido, cuando se inyecta por vía intramuscular, puede tener un valor  $C_{\text{max}}$  sérico menor que el mismo SMIP cuando se inyecta por vía intramuscular en forma no adsorbida (por ejemplo, < 95% del

C<sub>max</sub> no adsorbido, < 80% del C<sub>max</sub> no adsorbido, < 50% del C<sub>max</sub> no adsorbido, o incluso < 30% del C<sub>max</sub> no adsorbido).

5 En algunas formas de realización, un SMIP adsorbido puede presentar una menor exposición sistémica total después de la inyección, con respecto al mismo SMIP inyectado en forma no adsorbida. Los niveles de exposición sistémica suelen expresarse como valores de AUC (área bajo la curva de concentración-tiempo) (por ejemplo, en nM·h). Ventajosamente, por ejemplo, un SMIP adsorbido puede tener, cuando se inyecta por vía intramuscular, un valor AUC sérico menor en las 24 horas después de la inyección que el mismo SMIP cuando se inyecta por vía intramuscular en forma no adsorbida (por ejemplo, < 90% del AUC no adsorbido, < 80% del AUC no adsorbido, o incluso < 50% del AUC no adsorbido, etc.).

### 10 **Inmunógenos**

15 Los inmunopotenciadores adsorbidos de la invención son útiles durante la inmunización. Por lo tanto, puede utilizarse un complejo adsorbido de la invención junto con uno o más inmunógenos. El complejo y el inmunógeno o inmunógenos pueden proporcionarse como una mezcla, o pueden proporcionarse por separado para su uso después de la mezcla. En algunas formas de realización, puede combinarse un inmunopotenciador de la invención con un inmunógeno en ausencia de una sal metálica insoluble, y posteriormente pueden administrarse a un mamífero o pueden combinarse con una sal metálica insoluble para la posterior administración a un mamífero.

20 La invención puede utilizarse con una gran variedad de inmunógenos, para el tratamiento o la protección frente a una gran variedad de enfermedades. El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria que proteja contra una enfermedad viral (por ejemplo, debida a un virus con envoltura o sin envoltura), una enfermedad bacteriana (por ejemplo, debida a una bacteria Gram negativa o Gram positiva), una enfermedad fúngica, una enfermedad parasitaria, una enfermedad autoinmunitaria, o cualquier otra enfermedad. El inmunógeno también puede ser útil en inmunoterapia, por ejemplo, para el tratamiento de un tumor/cáncer, la enfermedad de Alzheimer o una adicción.

25 El inmunógeno puede adoptar diversas formas, por ejemplo, un organismo completo, una vesícula de membrana externa, un polipéptido, un sacárido, un liposacárido, un conjugado (por ejemplo, de vehículo y un hapteno, o de un vehículo y un sacárido o liposacárido), etc. Cuando el inmunógeno es un polipéptido, será por lo general un polipéptido de superficie, por ejemplo, una adhesina, una hemaglutinina, una glicoproteína de la envoltura, una glicoproteína de la espícula, etc.

30 El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra un virus de la gripe, incluidos los virus de la gripe A y B. Actualmente se dispone de diversas formas de inmunógeno del virus de la gripe, por lo general basadas en el virus vivo o en el virus inactivado. Las vacunas inactivadas pueden estar basadas en viriones completos, viriones fraccionados o en antígenos de superficie purificados. Los antígenos de la gripe también pueden presentarse en forma de virosomas. La hemaglutinina es el principal inmunógeno en las vacunas inactivadas actuales, y las dosis de vacunas están estandarizadas tomando como referencia los niveles de HA, medidos por lo general mediante SRID. Las vacunas existentes contienen por lo general aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque pueden utilizarse dosis menores, por ejemplo, para los niños o en situaciones de pandemia, o cuando se utiliza un adyuvante. Se han utilizado dosis fraccionadas tal como ½ (es decir, 7,5 µg de HA por cepa), ¼ y ⅙, así como dosis más altas (por ejemplo, dosis 3x ó 9x [34,35]). Por lo tanto, las composiciones pueden incluir entre 35 0,1 µg y 150 µg de HA por cepa de gripe, preferentemente entre 0,1 µg y 50 µg, por ejemplo, 0,1 µg-20 µg, 0,1 µg-15 µg, 0,1 µg-10 µg, 0,1 µg-7,5 µg, 0,5 µg-5 µg, etc. Las dosis concretas incluyen, por ejemplo, aproximadamente 45, aproximadamente 30, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,75, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, etc. por cepa. Es habitual incluir prácticamente la misma masa de HA para cada cepa incluida en la vacuna, por ejemplo, de manera que la masa de HA para cada cepa se encuentre dentro del 10% de la masa media de HA por cepa, y preferentemente dentro del 5% de la media. Para las vacunas vivas, la dosificación se mide mediante la dosis infecciosa media en cultivo tisular (TCID<sub>50</sub>) en lugar del contenido de HA, y es típica una TCID<sub>50</sub> de entre 10<sup>6</sup> y 10<sup>8</sup> (preferentemente entre 10<sup>6,5</sup> y 10<sup>7,5</sup>) por cepa. En lugar de utilizar huevos SPF como sustrato para el crecimiento viral, en el que el virus se recolecta a partir de fluidos alantoideos infectados de huevos de gallina, pueden utilizarse 40 líneas celulares que dan soporte a la replicación del virus de la gripe. La línea celular será por lo general de origen mamífero, por ejemplo, MDCK. Los inmunógenos del virus de la gripe A pueden ser de cualquier cepa con un subtipo de hemaglutinina adecuado, por ejemplo H1, H3, H5, H7, H9, etc., tales como la cepa H1N1, H3N2 y/o H5N1.

50 El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra un hongo *Candida* tal como *C. albicans*. Por ejemplo, el inmunógeno puede ser un β-glucano, que puede conjugarse con una proteína transportadora. El glucano puede incluir enlaces β-1,3 y/o β-1,6. Los inmunógenos adecuados incluyen los descritos en las referencias 36 y 37.

65 El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra una bacteria *Streptococcus*, incluidas *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. Por ejemplo, el inmunógeno puede ser un sacárido capsular, que

puede conjugarse con una proteína transportadora. Para *S. agalactiae* el sacárido puede ser de uno o más de los serotipos Ia, Ib, II, III y/o V. Para *S. pneumoniae* el sacárido puede ser de uno o más de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y/o 23F. Además de (o en lugar de) inmunógeno(s) sacárido(s) capsular(es), pueden utilizarse inmunógenos polipeptídicos para provocar una respuesta inmunitaria antiestreptocócica protectora, por ejemplo, que comprenda RrgB, como se describe en la referencia 38.

El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra una bacteria *Staphylococcus*, incluidas *S. aureus* o *S. epidermidis*. Por ejemplo, el inmunógeno puede comprender un antígeno IsdA, un antígeno IsdB, un antígeno ClfA, un antígeno ClfB, un antígeno SdrD, un antígeno Spa, un antígeno EsxA, un antígeno EsxB, un antígeno Sta006, una hemolisina y/o un antígeno Sta011. Los inmunógenos adecuados de *S. aureus* y sus combinaciones se describen en la referencia 39.

El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra una bacteria meningocócica (*Neisseria meningitidis*). Por ejemplo, el inmunógeno puede ser un sacárido capsular, que puede conjugarse con una proteína transportadora. Los sacáridos capsulares resultan especialmente útiles para la protección contra los serogrupos meningocócicos A, C, W135 y/o Y. Además de (o en lugar de) inmunógeno(s) sacárido(s) capsular(es), pueden utilizarse inmunógenos polipeptídicos y/o vesículas de membrana externa para provocar una respuesta inmunitaria antimeningocócica protectora, especialmente para su uso contra el serogrupo B, por ejemplo como se describe en la referencia 40. Una cantidad típica de sacárido capsular por dosis unitaria de una vacuna se encuentra entre 2,5 µg-10 µg, aunque pueden utilizarse dosis menores con la invención debido a la naturaleza economizadora de antígeno de los adyuvantes.

El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra un virus de la hepatitis, tal como un virus de la hepatitis A, un virus de la hepatitis B, un virus de la hepatitis C y/o un virus de la hepatitis E. Por ejemplo, el inmunógeno puede ser un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg). Una cantidad típica de HBsAg por dosis unitaria de una vacuna se encuentra entre 5 µg-20 µg, pero pueden utilizarse dosis menores con la invención debido a la naturaleza economizadora de antígeno de los adyuvantes.

El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra un virus respiratorio sincicial. Los inmunógenos pueden ser de un VRS del grupo A y/o un VRS del grupo B. Los inmunógenos adecuados pueden comprender las glicoproteínas F y/o G, o fragmentos de las mismas, por ejemplo como se describe en las referencias 41 y 42.

El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra una bacteria *Chlamydia*, incluidas *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*. Los inmunógenos adecuados incluyen los descritos en las referencias 43-49.

El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra una bacteria *Escherichia coli*, incluidas las cepas patógenas extraintestinales. Los inmunógenos adecuados incluyen los descritos en las referencias 50-52.

El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra un coronavirus, tal como el coronavirus del SARS humano. Los inmunógenos adecuados pueden comprender la glicoproteína de la espícula.

El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra una bacteria *Helicobacter pylori*. Los inmunógenos adecuados incluyen CagA [53-56], VacA [57,58] y/o NAP [59-61].

El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra una bacteria *Corynebacterium diphtheriae*. Los inmunógenos adecuados incluyen el toxoide diftérico ("DT"). Una cantidad típica de DT por dosis unitaria de una vacuna pediátrica se encuentra entre 15 Lf-30 Lf ("unidades de floculación"), aunque pueden utilizarse dosis menores con la invención debido a la naturaleza economizadora de antígeno de los adyuvantes. También son típicas cantidades menores en las vacunas de refuerzo para adolescentes o adultos, por ejemplo entre 1-10 Lf/dosis.

El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra una bacteria *Clostridium tetani*. Los inmunógenos adecuados incluyen el toxoide tetánico ("TT"). Una cantidad típica de TT por dosis unitaria de una vacuna pediátrica se encuentra entre 5 Lf-15 Lf ("unidades de floculación"), aunque pueden utilizarse dosis menores con la invención debido a la naturaleza economizadora de antígeno de los adyuvantes. También son típicas cantidades menores en las vacunas de refuerzo para adolescentes o adultos, por ejemplo entre 1-5 Lf/dosis.

El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra una bacteria *Bordetella pertussis*. Los antígenos de pertussis son celulares (célula entera, en forma de células inactivadas de *B. pertussis*; "wP") o acelular ("aP"). Cuando se utilizan antígenos acelulares, se incluyen uno, dos o (preferentemente) tres de los siguientes antígenos: (1) la toxina de pertussis destoxificada (toxóide de pertussis o "PT"); (2) la hemaglutinina filamentosa ("FHA"); (3) la pertactina (también conocida como la "proteína de membrana externa de 69 kiloDaltons"). La PT puede destoxificarse químicamente o puede ser una PT mutante en la que la actividad enzimática se ha reducido mediante mutagénesis [62], por ejemplo, el doble mutante 9K/129G [63]. Además de PT, FHA y pertactina, también es posible incluir fimbrias (por ejemplo, aglutinógenos 2 y 3) en un componente de antígeno de pertussis acelular. Una cantidad típica de PT en una vacuna pediátrica es 10-30 µg/dosis. Una cantidad típica de la FHA en una vacuna

pediátrica es 15-30 µg/dosis. Una cantidad típica de pertactina en una vacuna pediátrica es 2-10 µg/dosis. Pueden utilizarse dosis menores con la invención debido a la naturaleza economizadora de antígeno de los adyuvantes. También son típicas cantidades menores en las vacunas de refuerzo, por ejemplo aproximadamente 3 veces menores.

5 El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra una bacteria *Haemophilus influenzae* tipo B ("Hib"). Los inmunógenos adecuados incluyen conjugados del sacárido capsular de Hib ("PRP"), por ejemplo conjugado con el toxoide tetánico, el toxoide diftérico, el derivado CRM197 del toxoide diftérico, la proteína D de *H. influenzae* y un complejo proteico de membrana externa del meningococo del serogrupo B. Una cantidad típica de conjugado Hib (medido como sacárido) se encuentra entre 2,5 µg-15 µg por dosis, aunque pueden utilizarse dosis menores con la invención debido a la naturaleza economizadora de antígeno de los adyuvantes.

15 El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra un poliovirus. Los inmunógenos adecuados incluyen virus inactivados. Una composición típica incluirá tres antígenos de poliovirus - poliovirus tipo 1 (por ejemplo, cepa Mahoney), poliovirus tipo 2 (por ejemplo, cepa MEF-1) y poliovirus tipo 3 (por ejemplo, cepa Saukett). Una cantidad típica de poliovirus por dosis es 40 DU ("unidad de antígeno D") para el tipo 1, 8 DU para el tipo 2 y 32 DU para el tipo 3, aunque pueden utilizarse dosis menores con la invención debido a la naturaleza economizadora de antígeno de los adyuvantes.

20 El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra un citomegalovirus ("CMV"). Por ejemplo, el inmunógeno puede ser una glicoproteína B recombinante, por ejemplo el antígeno soluble utilizado en la referencia 64.

25 El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra un virus de la inmunodeficiencia humana, por ejemplo contra el VIH-1 o el VIH-2. Por ejemplo, el inmunógeno puede ser una glicoproteína de la envoltura del VIH. Por ejemplo, se dispone de glicoproteínas de la envoltura de bioingeniería, tales como gp140, la cual puede formar oligómeros (conocidos como "o-gp140"). El polipéptido gp140 incluye la secuencia de gp120 y el ectodominio de gp41 [65], y se ha notificado que es un inmunógeno mejor que gp120 [66]. Por lo tanto, una glicoproteína de la envoltura útil puede incluir una porción de gp41 pero no incluir su dominio transmembrana. La forma gp140 de la glicoproteína de la envoltura puede tener suprimido su bucle V2, para dar mutantes gp140ΔV2, y se ha notificado que tales supresiones mejoran la inmunogenicidad. Se ha demostrado que los mutantes ΔV2 de gp140 forman trímeros [67].

35 El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra el virus de la rabia. Un inmunógeno adecuado es un virus de la rabia inactivado [68, RabAvert™].

40 El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra un virus del papiloma humano. Los inmunógenos útiles son la proteína L1 de la cápside, que puede ensamblarse para formar estructuras conocidas como partículas pseudovíricas (VLP). Las VLP pueden producirse mediante expresión recombinante de L1 en células de levadura (por ejemplo, en *S. cerevisiae*) o en células de insecto (por ejemplo, en células de *Spodoptera*, tal como *S. frugiperda*, o en células de *Drosophila*). Para las células de levadura, los vectores plasmídicos pueden portar el gen o los genes de L1; para las células de insectos, los vectores de baculovirus pueden portar el gen o los genes de L1. Más preferentemente, la composición incluye las VLP de L1 de cepas VPH-16 y VPH-18. Se ha demostrado que esta combinación bivalente es muy eficaz [69]. Además de las cepas VPH-16 y VPH-18, también es posible incluir las VLP de L1 de las cepas HPV-6 y HPV-11.

50 El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra un antígeno tumoral, tal como MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3 (MAGE-A3), MART-1/Melan A, tirosinasa, gp100, TRP-2, etc. El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunoterapéutica contra el cáncer de pulmón, el melanoma, el cáncer de mama, el cáncer de próstata, etc.

55 El inmunógeno puede provocar una respuesta inmunitaria contra un hapteno conjugado con una proteína transportadora, en el que el hapteno es un estupefaciente [70]. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, opiáceos, marihuana, anfetaminas, cocaína, barbitúricos, glutetimida, metiprilona, hidrato de cloral, metacualona, benzodiazepinas, LSD, nicotina, fármacos anticolinérgicos, fármacos antipsicóticos, triptamina, otros fármacos psicomiméticos, sedantes, fenciclidina, psilocibina, nitrito volátil y otros fármacos que inducen dependencia física y/o psicológica.

60 Pueden utilizarse diversos otros inmunógenos.

#### Composiciones para la inmunización contra *Neisseria meningitidis*

65 La invención es especialmente útil para la inmunización contra el meningococo, por ejemplo contra el serogrupo B.

#### Composiciones con múltiples inmunógenos diferentes

La presente descripción proporciona una composición que comprende un complejo adyuvante de la descripción en combinación con al menos dos inmunógenos diferentes.

5 La descripción también proporciona un kit que comprende (i) un complejo adyuvante en un primer recipiente y (ii) al menos un inmunógeno en un segundo recipiente. El primer recipiente puede incluir opcionalmente al menos un inmunógeno, además del complejo.

10 El agonista de TLR en el complejo adyuvante puede ser cualquier agonista tal como se describe en el presente documento.

En algunas formas de realización, el agonista de TLR es un agonista de TLR7 según cualquiera de las fórmulas, (C), (D), (E) o (H). En algunas formas de realización, el agonista de TLR es un agonista de TLR8 según la fórmula (G).

15 Los "al menos dos inmunógenos diferentes" pueden incluir al menos un antígeno bacteriano y al menos un antígeno viral.

20 Si los "al menos dos inmunógenos diferentes" incluyen sólo inmunógenos bacterianos, entonces lo ideal es que incluyan inmunógenos para al menos dos especies diferentes de bacterias (excluyendo así, por ejemplo, una combinación de diferentes sacáridos capsulares de meningococo, ya que todos ellos son de una sola especie).

25 Los "al menos dos inmunógenos diferentes" no deben estar conjugados entre sí. Por lo tanto, un conjugado de sacárido de Hib y un toxoide tetánico no es "al menos dos inmunógenos diferentes" tal como se utiliza en el presente documento.

30 Las formas de realización preferentes de "al menos dos inmunógenos diferentes" incluyen composiciones que incluyen: (i) un toxoide diftérico, un toxoide tetánico y un antígeno de pertussis acelular, por ejemplo que comprende un toxoide de pertussis, una hemaglutinina filamentososa y/o una pertactina, (ii) un toxoide diftérico, un toxoide tetánico, un antígeno de pertussis y un conjugado de sacárido capsular de *H. influenzae* tipo B, (iii) un toxoide diftérico, un toxoide tetánico, un antígeno de pertussis y un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, (iv) un toxoide diftérico, un toxoide tetánico, un antígeno de pertussis, un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y un conjugado de sacárido capsular de *H. influenzae* B tipo, (v) un toxoide diftérico, un toxoide tetánico, un antígeno de pertussis y un antígeno de poliovirus inactivado, (vi) un toxoide diftérico, un toxoide tetánico, un antígeno de pertussis, un conjugado de sacárido capsular de *H. influenzae* tipo B, un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y un antígeno de poliovirus inactivado, o (vii) un antígeno del virus de la hepatitis A y un antígeno del virus de la hepatitis B.

40 Cuando una composición incluye un antígeno de poliovirus inactivado, preferentemente incluye antígenos de cada una de poliovirus tipo 1 (por ejemplo, cepa Mahoney), poliovirus de tipo 2 (por ejemplo, cepa MEF-1) y poliovirus tipo 3 (por ejemplo, cepa Saukett).

45 Cuando una composición incluye un antígeno de pertussis, lo ideal es que no incluya células completas inactivadas de *B. pertussis*, es decir, lo ideal es que la vacuna sea acelular.

50 Además de incluir antígenos D, T, Pa, HBsAg, Hib y/o de poliovirus, una composición de la invención puede incluir antígenos adicionales, por ejemplo de otros patógenos. Por ejemplo, estos antígenos pueden ser de *N. meningitidis* (uno o más de los serogrupos A, B, C, W 135 y/o Y) o de *S. pneumoniae*. Por lo tanto, una composición puede incluir dos o tres de: (i) uno o más de entre los antígenos D, T, Pa, HBsAg, Hib y/o de poliovirus, (ii) un conjugado de sacárido capsular de uno o más de los serogrupos meningocócicos A, C, W135 y/o Y, (iii) un antígeno polipeptídico de meningococo, tal como un fHbp.

Las composiciones de la invención que incluyen múltiples inmunógenos, no incluyen preferentemente vesículas de membrana externa bacteriana.

## 55 **Agonismo de TLR**

60 La invención utiliza agonistas de TLR que comprenden un resto adsorbente y un resto agonista de TLR. El resto adsorbente confiere la capacidad de adsorberse a una sal metálica insoluble (véase más arriba), mientras que el resto agonista de TLR confiere la capacidad de actuar como agonista de un receptor de tipo Toll. Por lo general, un agonista de TLR de la invención actuaría por lo tanto como agonista de TLR incluso sin su resto adsorbente. Salvo cuando se indique lo contrario, los agonistas de TLR de la invención pueden activar cualquiera de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 o TLR11.

65 Cuando la descripción proporciona o se refiere a un compuesto como agonista de TLR, el compuesto es preferentemente un agonista de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 o TLR11. De este grupo, un subgrupo preferente es TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 y TLR11. Un subgrupo más

preferente es TLR2, TLR7 y TLR8. Otro subgrupo preferente es TLR2 y TLR7.

Lo más preferentemente, un agonista de TLR es un agonista de un TLR humano.

5 La actividad agonista de un compuesto contra cualquier receptor tipo Toll concreto puede determinarse mediante ensayos convencionales. Empresas tales como Imgenex, Invivogen suministran líneas celulares que están  
 10 cotransfectadas de manera estable con NFκB y genes de TLR humanos, además de genes indicadores adecuados, para medir las vías de activación de TLR. Están diseñadas para la sensibilidad, una dinámica de intervalo de trabajo amplio y pueden utilizarse para el cribado de alto rendimiento. La expresión constitutiva de uno o dos TLR  
 10 específicos es típica en tales líneas celulares. Véase también la referencia 74.

15 Una composición puede incluir unos agonistas de TLR primero y segundo. Estos dos agonistas son diferentes entre sí y se dirigen a diferentes TLR. Ambos agonistas se adsorben a una sal de aluminio. Pueden adsorberse conjuntamente a una sal de aluminio o pueden adsorberse por separado a sales de aluminio (preferentemente la misma sal, por ejemplo, ambos a hidróxido de aluminio) y a continuación combinarse. Se conocen combinaciones de TLR por ejemplo a partir de la referencia 75.

### **Procesos de precipitación *in situ***

20 La descripción proporciona un proceso para preparar un complejo adyuvante, que comprende las etapas de (i) preparar una mezcla acuosa de un agonista de TLR y una sal de aluminio soluble, a continuación, (ii) añadir una sal que no sea de aluminio a la mezcla acuosa con el fin de formar una sal de aluminio precipitada a la que se adsorbe el agonista de TLR.

25 La descripción también proporciona un proceso para preparar una composición inmunogénica, que comprende una etapa de mezclar (i) una mezcla acuosa de un agonista de TLR y una sal de aluminio soluble con (ii) una mezcla acuosa tamponada de un inmunógeno, en el que la etapa de mezcla hace precipitar una sal de aluminio a la que se adsorben el agonista de TLR y el inmunógeno.

30 La descripción también proporciona un proceso para preparar una composición inmunogénica, que comprende una etapa de mezclar (i) una solución acuosa de una sal de aluminio soluble con (ii) una mezcla acuosa tamponada de un inmunógeno y un agonista de TLR, en el que la etapa de mezcla hace precipitar una sal de aluminio a la que se adsorben el agonista de TLR y el inmunógeno.

35 La descripción también proporciona un proceso para preparar una composición inmunogénica, que comprende una etapa de mezclar (i) una solución acuosa de una sal de aluminio soluble y un inmunógeno con (ii) una mezcla acuosa tamponada de un agonista de TLR, en el que la etapa de mezcla hace precipitar una sal de aluminio a la que se adsorben el agonista de TLR y el inmunógeno.

40 La descripción también proporciona composiciones inmunogénicas obtenidas o que pueden obtenerse mediante estos procesos.

45 En estos procesos la sal de aluminio soluble será por lo general alumbre ( $KAl(SO_4)_2$ ), por lo general en forma de  $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$  o cloruro de aluminio. La adición de un anión alternativo a esta sal soluble puede hacer precipitar *in situ* un adyuvante de sal de aluminio.

50 El anión alternativo se añade por lo general como parte de un tampón. Por lo tanto, por ejemplo, si se añade un tampón de fosfato a la sal de aluminio soluble, entonces puede precipitar un adyuvante de fosfato de aluminio. El tampón será por lo general un tampón de acetato, carbonato o fosfato. La adición del tampón a una solución de alumbre conduce a la precipitación de un hidroxí(anión del tampón)sulfato de aluminio amorfo, por ejemplo hidroxifosfato sulfato de aluminio (véase el capítulo 9 de la referencia 32). El inmunógeno y el agonista de TLR pueden adsorberse a la sal precipitada.

55 El proceso puede implicar la adición de una solución de un inmunógeno deseado en un tampón de fosfato. Estos procesos pueden conducir a composiciones en las que el inmunógeno y/o el agonista de TLR se adsorben a un hidroxifosfato sulfato de aluminio.

### **Ensayos analíticos**

60 En el presente documento también se describe un ensayo para analizar un complejo adyuvante que comprende un agonista de TLR adsorbido a una sal metálica insoluble, que comprende las etapas de: (i) tratar el complejo para desorber el agonista de TLR de la sal metálica insoluble, a continuación, (ii) detectar el agonista de TLR desorbido.

65 Se dispone de diversas técnicas para la desorción, como se requiere en la etapa (i). Por ejemplo, el complejo puede tratarse con un compuesto adsorbente que tenga mayor afinidad por la sal metálica y que de este modo desplace al agonista de TLR adsorbido. Otro método implica incubar el complejo con una alta concentración



de un tampón de fosfato, de manera que los iones del tampón desplacen al agonista de TLR adsorbido. En otro método se utilizan mezclas de sales y detergentes, por ejemplo, véase la referencia 76. En otro método se disuelve la sal metálica insoluble, eliminando así al mismo tiempo la adsorción; las formas adecuadas para disolver tales sales incluyen, por ejemplo, puede utilizarse citrato a un pH apropiado para disolver los adyuvantes de sales de aluminio, así como otros ácidos  $\alpha$ -hidroxi carboxílicos o polibásicos.

La detección en la etapa (ii) puede ser cualitativa, cuantitativa o semicuantitativa. Por lo tanto, la etapa de detección puede simplemente confirmar que se ha producido la desorción, o puede utilizarse para cuantificar la cantidad de agonista que había sido adsorbido a la sal metálica. Pueden utilizarse técnicas tales como HPLC para la detección cuantitativa de los agonistas desorbidos.

La descripción también proporciona un ensayo para analizar un complejo adyuvante que comprende un agonista de TLR adsorbido a una sal metálica insoluble, que comprende las etapas de: (i) tratar el complejo para desorber el agonista de TLR de la sal metálica insoluble, a continuación, (ii) ensayar la actividad biológica del agonista de TLR desorbido. Las técnicas para ensayar la actividad de los agonistas son bien conocidas en la técnica (véase más arriba). Este ensayo, especialmente cuando la actividad se analiza cuantitativamente, puede utilizarse para confirmar la estabilidad del material adsorbido, por ejemplo, para comprobar que la actividad total del material que estaba adsorbido a las sales se conserva después de la desorción. Si se desorbe todo el material, pero se ha perdido la actividad, esto puede indicar que el material se ha degradado mientras estaba adsorbido.

### **Productos y composiciones farmacéuticas**

La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un agonista de TLR de la invención y una sal metálica insoluble. Esta composición también puede incluir un inmunógeno.

La descripción proporciona un método para preparar una composición farmacéutica, que comprende una etapa de combinar un agonista de TLR de la invención con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La descripción también proporciona un método para preparar una composición farmacéutica, que comprende una etapa de combinar un complejo de la invención con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas suelen incluir componentes además del agonista de TLR, una sal metálica insoluble y/o un inmunógeno, por ejemplo, incluyen por lo general uno o más excipientes y/o vehículos farmacéuticos. Se dispone de un análisis detallado de estos componentes en la referencia 77.

Las composiciones farmacéuticas están preferentemente en forma acuosa, especialmente en el momento de la administración, pero también pueden presentarse en formas líquidas no acuosas o en formas secadas, por ejemplo en forma de cápsulas de gelatina o de liofilizados, etc.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más conservantes, tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Resultan preferentes las composiciones sin mercurio, y pueden prepararse vacunas sin conservantes.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una sal fisiológica, tal como una sal de sodio, por ejemplo para controlar la tonicidad. Es típico el cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente a una concentración entre 1 mg/ml y 20 mg/ml, por ejemplo 1,0 $\pm$ 2 mg/ml ó 9 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro potásico, dihidrogenofosfato de potasio, fosfato disódico dihidrato, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, etc.

Las composiciones farmacéuticas pueden tener una osmolalidad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, por ejemplo, entre 240-360 mOsm/kg o entre 290-310 mOsm/kg.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir compuestos (con o sin una sal metálica insoluble) en agua pura (por ejemplo, agua para inyectables) pero por lo general incluirán uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón de fosfato, un tampón Tris, un tampón de borato, un tampón de succinato; un tampón de histidina (especialmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio) o un tampón de citrato. Por lo general se incluirán sales tampón en el intervalo de 5 mM y 20 mM. Si se utiliza un tampón de fosfato, entonces la concentración de iones fosfato debería ser, en algunas formas de realización, < 50 mM (véase más arriba), por ejemplo, < 10 mM.

Las composiciones farmacéuticas tienen por lo general un pH entre 5,0 y 9,5 por ejemplo, entre 6,0 y 8,0.

Las composiciones farmacéuticas son preferentemente estériles.

Las composiciones farmacéuticas son preferentemente apirógenas, conteniendo por ejemplo < 1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis y, preferentemente < 0,1 UE por dosis.

Las composiciones farmacéuticas están preferentemente libres de gluten.

Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para administrarse a pacientes animales (y, en particular, humanos) y, por lo tanto, incluyen tanto usos humanos como veterinarios. Pueden utilizarse en un método para provocar una respuesta inmunitaria en un paciente, que comprende la etapa de administrar la composición al paciente. Las composiciones pueden administrarse antes de haberse expuesto el sujeto a un patógeno y/o después de haberse expuesto el sujeto a un patógeno.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en forma de dosis unitaria. En algunas formas de realización, una dosis unitaria puede tener un volumen de entre 0,1 ml-1,0 ml, por ejemplo aproximadamente 0,5 ml.

La descripción también proporciona un dispositivo de administración (por ejemplo, jeringa, nebulizador, pulverizador, inhalador, parche dérmico, etc.) que contiene una composición farmacéutica de la invención, por ejemplo que contiene una dosis unitaria. Este dispositivo puede utilizarse para administrar la composición a un sujeto vertebrado.

La descripción también proporciona un recipiente estéril (por ejemplo, un vial) que contiene una composición farmacéutica de la invención, por ejemplo que contiene una dosis unitaria.

La descripción también proporciona una dosis unitaria de una composición farmacéutica de la invención.

La descripción también proporciona un recipiente hermético que contiene una composición farmacéutica de la invención. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, un vial.

La descripción también proporciona un kit que comprende unos componentes del kit primero y segundo, en el que: (i) el primer componente del kit comprende una sal metálica insoluble y un inmunógeno, y (ii) el segundo componente del kit comprende un compuesto agonista de TLR de la invención. Lo ideal es que el segundo componente no incluya una sal metálica insoluble y/o no incluya un inmunógeno. Los componentes primero y segundo pueden combinarse para proporcionar una composición adecuada para su administración a un sujeto.

La descripción también proporciona un kit que comprende unos componentes del kit primero y segundo, en el que: (i) el primer componente del kit comprende una sal metálica insoluble y un compuesto agonista de TLR de la invención, y (ii) el segundo componente del kit comprende un inmunógeno. Lo ideal es que el segundo componente no incluya una sal metálica insoluble y/o un agonista de TLR. En algunas formas de realización, el segundo componente está liofilizado. Los componentes primero y segundo pueden combinarse para proporcionar una composición farmacéutica adecuada para administrarse a un sujeto.

La descripción también proporciona un kit que comprende unos componentes del kit primero y segundo, en el que: (i) el primer componente del kit comprende un inmunógeno y un compuesto agonista de TLR de la invención, y (ii) el segundo componente del kit comprende una sal metálica insoluble. Lo ideal es que el segundo componente no incluya un inmunógeno y/o un agonista de TLR. Los componentes primero y segundo pueden combinarse para proporcionar una composición farmacéutica adecuada para administrarse a un sujeto.

En algunas formas de realización estos kits comprenden dos viales. En otras formas de realización comprenden una jeringa precargada y un vial, mezclándose el contenido de la jeringa con el contenido del vial antes de la inyección. Un dispositivo de jeringa/vial es útil cuando el contenido del vial está liofilizado. Sin embargo, generalmente ambos componentes del kit primero y segundo estarán en forma líquida acuosa.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse de diversas formas. Por ejemplo, las composiciones pueden prepararse como inyectables, ya sea como suspensiones o soluciones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección (por ejemplo, una composición liofilizada o una composición liofilizada por pulverización). La composición puede prepararse para la administración tópica, por ejemplo en forma de pomada, crema o polvo. La composición puede prepararse para la administración por vía oral, por ejemplo, en forma de comprimido o cápsula, de aerosol o de jarabe (opcionalmente aromatizado). La composición puede prepararse para la administración pulmonar, por ejemplo mediante un inhalador, utilizando un polvo fino o un aerosol. La composición puede prepararse en forma de supositorio o pesario. La composición puede prepararse para la administración nasal, ótica u ocular, por ejemplo en forma de aerosol o gotas. La composición puede estar en forma de kit, diseñado de manera que se reconstituya una composición combinada justo antes de la administración al paciente. Tales kits pueden comprender uno o más antígenos en forma líquida y uno o más antígenos liofilizados. Son típicos los inyectables para la administración intramuscular.

Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un agonista de TLR, es decir, una cantidad que, cuando se administra a un individuo, ya sea en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para potenciar la respuesta inmunitaria contra un inmunógeno administrado conjuntamente. Esta cantidad puede variar dependiendo de la salud y el estado físico del individuo a tratar, la edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar

(por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación por parte del médico tratante de la situación médica, y otros factores pertinentes. La cantidad se encontrará dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante ensayos de rutina. Puede utilizarse una cantidad de entre 1-1.000 µg/dosis, por ejemplo de 5-100 µg por dosis o de 10-100 µg por dosis, y lo ideal es ≤ 300 µg por dosis, por ejemplo 5 µg, 10 µg, 20 µg, 25 µg, 50 µg ó 100 µg por dosis. Por lo tanto, la concentración de un agonista de TLR en una composición de la invención puede ser de 2-2.000 µg/ml, por ejemplo, de 10-200 µg/ml, o aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml ó 200 µg/ml, y lo ideal es ≤ 600 µg/ml. Estos intervalos de dosis y dosificaciones específicas, resultan especialmente útiles para los compuestos de fórmula (IA) o (IV).

### Métodos de tratamiento, y administración de las composiciones inmunogénicas

La descripción proporciona un agonista de TLR, un complejo y/o una composición de la invención, para su uso en un método para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

La descripción también proporciona el uso de un agonista de TLR o un complejo de la invención en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

La descripción también proporciona el uso de (i) un agonista de TLR como se define en el presente documento y (ii) una sal metálica insoluble en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto. Del mismo modo, la descripción también proporciona el uso de (i) un agonista de TLR como se define en el presente documento, (ii) una sal metálica insoluble y (iii) un inmunógeno en la fabricación de un medicamento (por ejemplo, una vacuna) para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

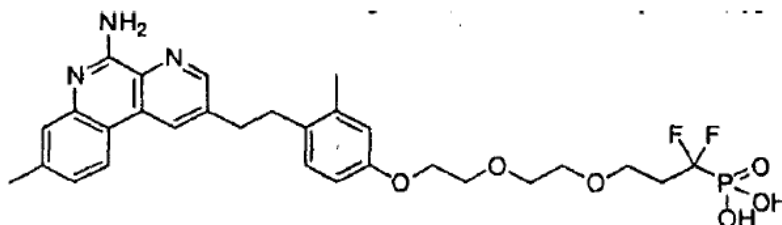
La invención es adecuada para provocar la respuesta inmunitaria en sujetos humanos o animales no humanos (en particular mamíferos). Las composiciones preparadas según la invención pueden utilizarse para tratar tanto niños como adultos.

La respuesta inmunitaria estimulada por estos usos incluirá generalmente una respuesta de anticuerpos, preferentemente una respuesta de anticuerpos protectora. Los métodos para evaluar las respuestas de anticuerpos después de la inmunización son bien conocidos en la técnica.

El tratamiento puede ser por un régimen monodosis o un régimen multidosis. Pueden utilizarse dosis múltiples en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. La administración de más de una dosis (por lo general dos dosis) es especialmente útil en pacientes que no han desarrollado anticuerpos contra el antígeno. Las dosis múltiples se administrarán por lo general con al menos 1 semana de diferencia (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, etc.).

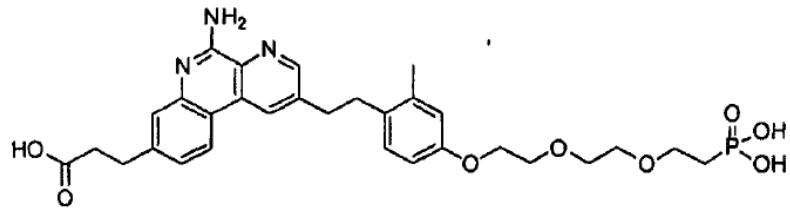
### Compuestos ejemplares

Los compuestos 1 a 102 que se presentan a continuación contienen restos adsorbentes acoplados a estructuras centrales que han demostrado ser agonistas de TLR. Por lo tanto, estos compuestos pueden adsorberse a sales metálicas insolubles, como se describe en el presente documento. Por lo tanto, la invención proporciona cada uno de los siguientes compuestos (los compuestos que no forman parte de la invención se marcan como compuestos de referencia):



**Compuesto de Referencia 1:** ácido (3-(2-(2-(4-(2-(5-amino-8-metilbenzo[f][1,7]naftiridin-2-il)etil)-3-metilfenoxi)etoxi)etoxi)-1,1-difluoropropil)fosfónico

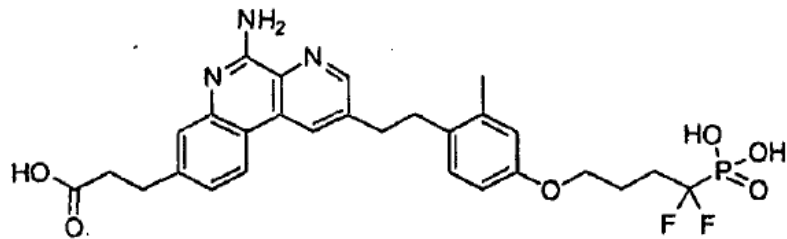
5



10

15 **Compuesto de Referencia 2:** ácido 3-(5-amino-2-(2-metil-4-(2-(2-(2-fosfonoetoxi)etoxi)etoxi)fenetil)benzo[f][1,7]naftiridin-8-il)propanoico

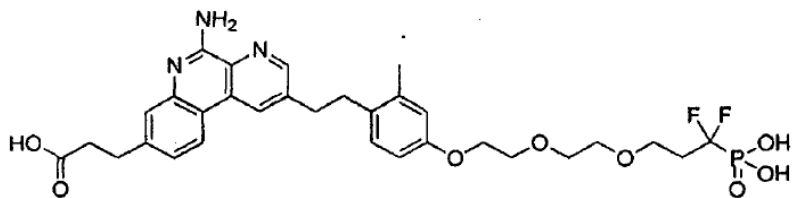
20



25

30 **Compuesto de Referencia 3:** ácido 3-(5-amino-2-(4-(4,4-difluoro-4-fosfonobutoxi)-2-metilfenil)benzo[f][1,7]naftiridin-8-il)propanoico

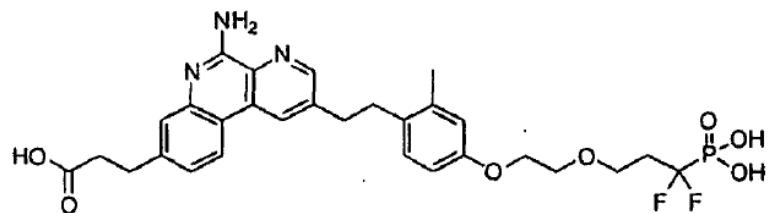
35



40

45 **Compuesto de Referencia 4:** ácido 3-(5-amino-2-(4-(2-(2-(3,3-difluoro-3-fosfonopropoxi)etoxi)etoxi)-2-metilfenil)benzo[f][1,7]naftiridin-8-il)propanoico

50



55

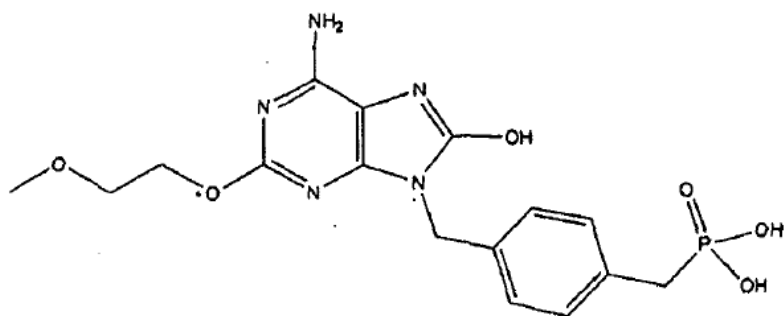
60 **Compuesto de Referencia 5:** ácido 3-(5-amino-2-(4-(2-(3,3-difluoro-3-fosfonopropoxi)etoxi)-2-metilfenil)benzo[f][1,7]naftiridin-8-il)propanoico

65

5

10

15



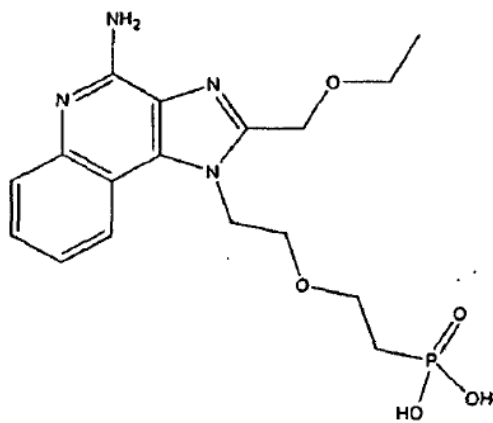
**Compuesto 6:** ácido (4-((6-amino-8-hidroxi-2-(2-metoxietoxi)-9H-purin-9-il)metil)encil)fosfónico

20

25

30

35



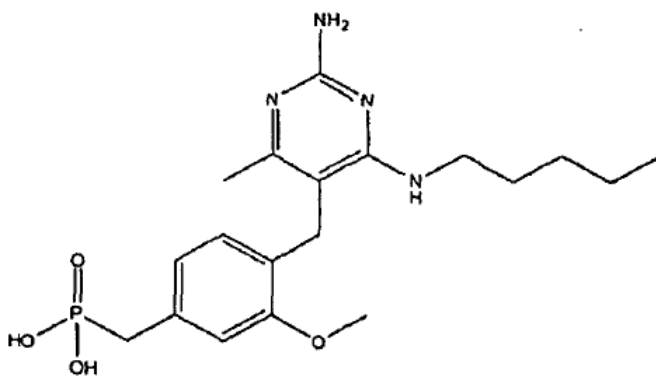
40

**Compuesto 7:** ácido (2-(2-(4-amino-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)etoxi)etil)fosfónico

45

50

55



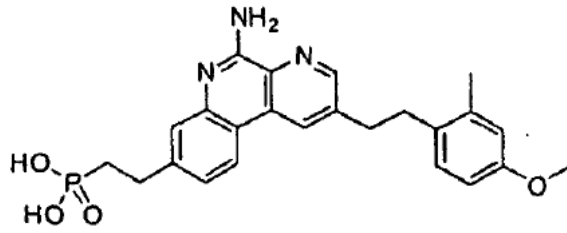
60

**Compuesto 8:** ácido (4-((2-amino-4-metil-6-(pentilamino)pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)fosfónico

65

5

10

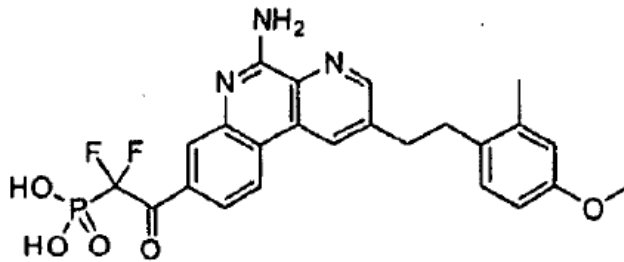


15

**Compuesto de Referencia 9:** ácido (2-(5-amino-2-(4-metoxi-2-metilfenetil)benzo[f][1,7]naftiridin-8-il)etil)fosfónico

20

25

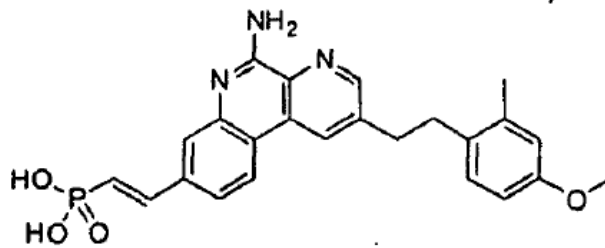


30

**Compuesto de Referencia 10:** ácido (2-(5-amino-2-(4-metoxi-2-metilfenetil)benzo[f][1,7]naftiridin-8-il)-1,1-difluoro-2-oxoetil)fosfónico

35

40

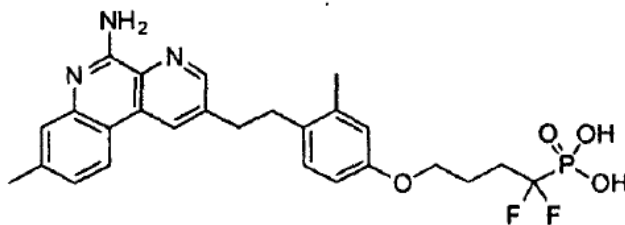


45

**Compuesto de Referencia 11:** ácido (E)-(2-(5-amino-2-(4-metoxi-2-metilfenetil)benzo[f][1,7]naftiridin-8-il)vinil)fosfónico

50

55

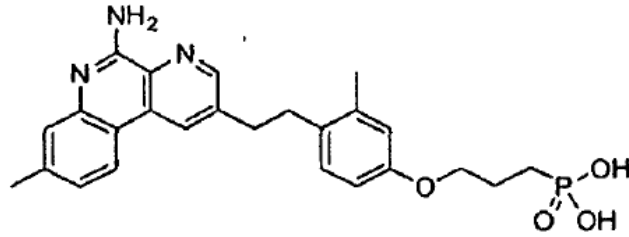


60

**Compuesto de Referencia 12:** ácido (4-(4-(2-(5-amino-8-metilbenzo[f][1,7]naftiridin-2-il)etil)-3-metilfenoxi)-1,1-difluorobutil)fosfónico

65

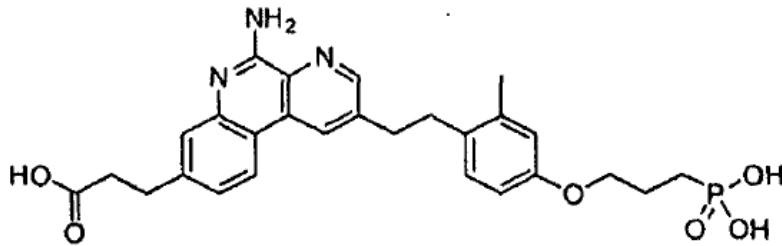
5



10

15 **Compuesto de Referencia 13:** ácido (3-(4-(2-(5-amino-8-metilbenzo[f][1,7]naftiridin-2-il)etil)-3-metilfenoxi)propil)fosfónico

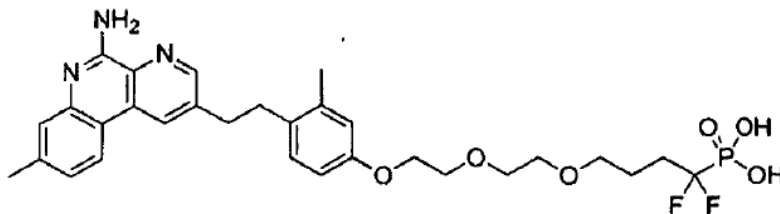
20



25

30 **Compuesto de Referencia 14:** ácido 3-(5-amino-2-(2-metil-4-(3-fosfonopropoxi)fenetil)benzo[f][1,7]naftiridin-8-il)propanoico

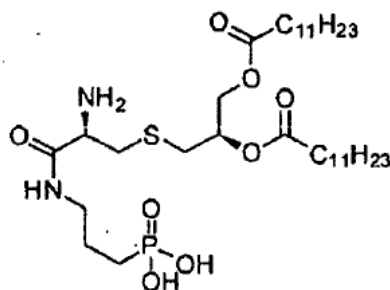
35



40

45 **Compuesto de Referencia 15:** ácido (4-(2-(2-(4-(2-(5-amino-8-metilbenzo[f][1,7]naftiridin-2-il)etil)-3-metilfenoxi)etoxi)etoxi)-1,1-difluorobutil)fosfónico

50



55

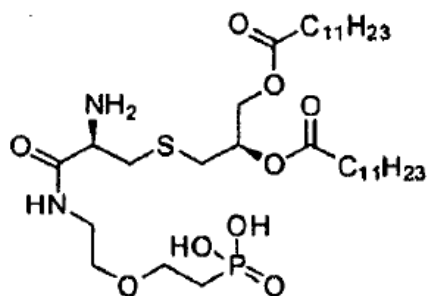
60

65 **Compuesto de Referencia 16:** ácido (3-((R)-2-amino-3-(((R)-2,3-bis(dodecanoiloxi)propil)tio)propanamido)propil)fosfónico

5

10

15

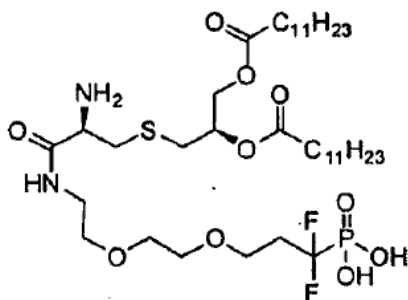


20

**Compuesto de Referencia 17:** ácido ((8R,12R)-8-amino-12-(dodecanoiloxi)-7,15-dioxo-3,14-dioxa-10-tia-6-azahexacosil)fosfónico

25

30



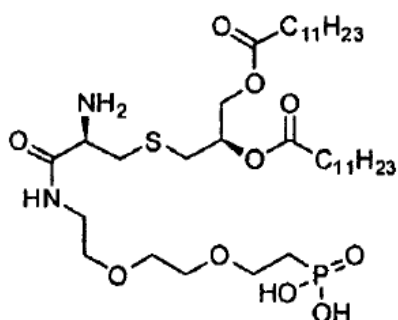
35

**Compuesto de Referencia 18:** ácido ((12R,16R)-12-amino-16-(dodecanoiloxi)-1,1-difluoro-11,19-dioxo-4,7,18-trioxa-14-tia-10-azatriacontil)fosfónico

40

45

50



55

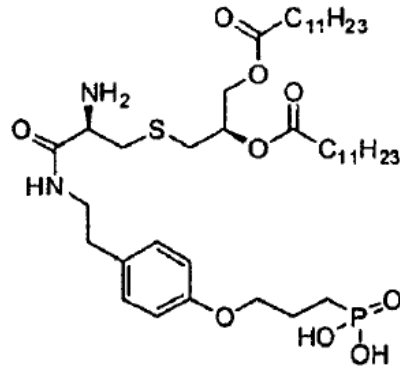
**Compuesto de Referencia 19:** ácido ((11R,15R)-11-amino-15-(dodecanoiloxi)-10,18-dioxo-3,6,17-trioxa-13-tia-9-azanonacosil)fosfónico

60

65



5

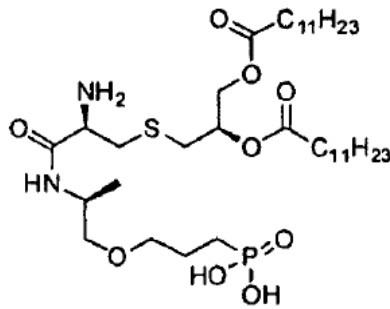


10

15

20 **Compuesto de Referencia 20:** ácido (3-(4-(2-((R)-2-amino-3-(((R)-2,3-bis(dodecanoiloxi)propil)tio)propanamido)etil)fenoxi)propil)fosfónico

25



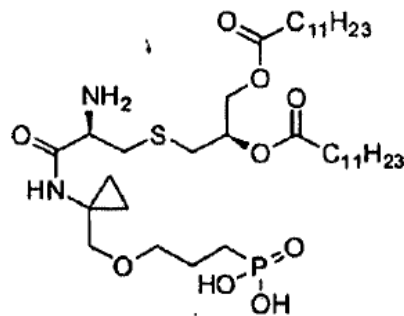
30

35

40 **Compuesto de Referencia 21:** ácido ((6S,9R,13R)-9-amino-13-(dodecanoiloxi)-6-metil-8,16-dioxo-4,15-dioxa-11-tia-7-azaheptacosil)fosfónico

40

45



50

55

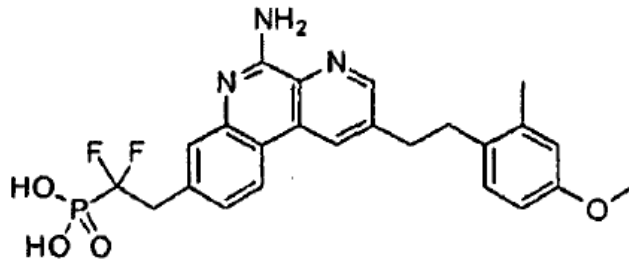
60 **Compuesto de Referencia 22:** ácido (3-((1-((R)-2-amino-3-(((R)-2,3-bis(dodecanoiloxi)propil)tio)propanamido)ciclopropil)metoxi)propil)fosfónico

60

65

5

10

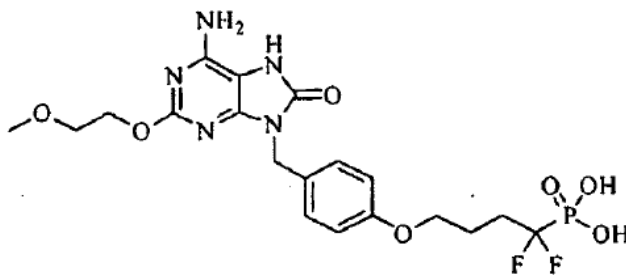


15

**Compuesto de Referencia 23:** ácido (2-(5-amino-2-(4-metoxi-2-metilfenil)benzo[f][1,7]naftiridin-8-il)-1,1-difluoroetil)fosfónico

20

25

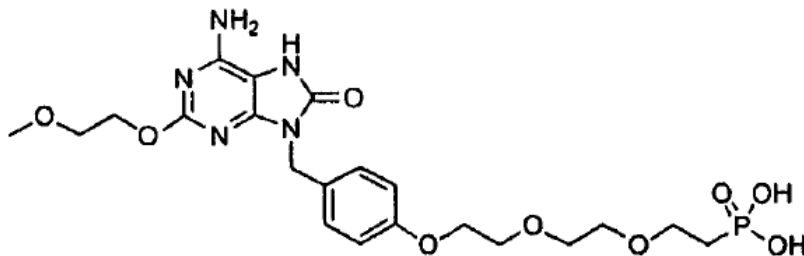


30

**Compuesto 24:** ácido (4-(4-((6-amino-2-(2-metoxietoxi)-8-oxo-7H-purin-9(8H)-il)metil)fenoxi)-1,1-difluorobutil)fosfónico

35

40



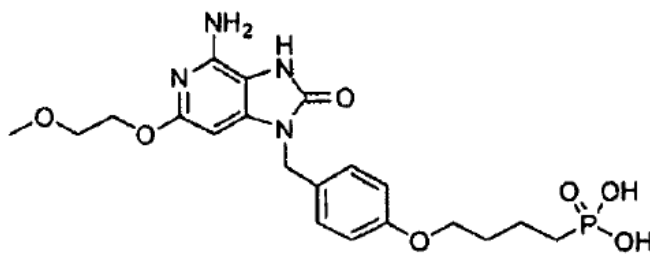
45

**Compuesto 25:** ácido (2-(2-(2-(4-((6-amino-2-(2-metoxietoxi)-8-oxo-7H-purin-9(8H)-il)metil)fenoxi)etoxi)etoxi)etil)fosfónico

50

55

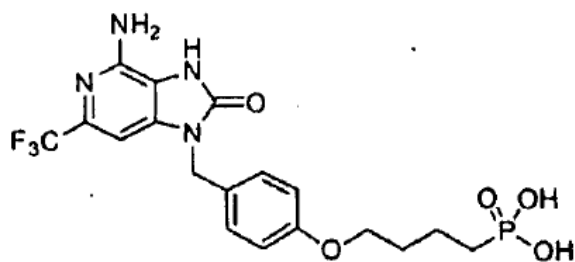
60



65

**Compuesto 26:** ácido (4-(4-((4-amino-6-(2-metoxietoxi)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il)metil)fenoxi)butil)fosfónico

5

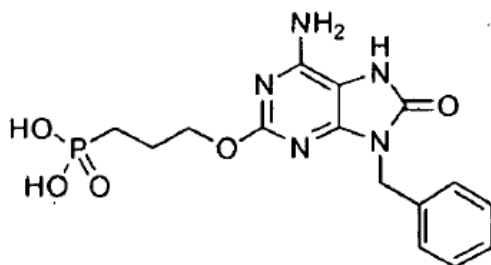


10

15

**Compuesto 27:** ácido (4-(4-((4-amino-2-oxo-6-(trifluorometil)-2,3-dihidro-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il)metil)fenoxi)butil)fosfónico

20

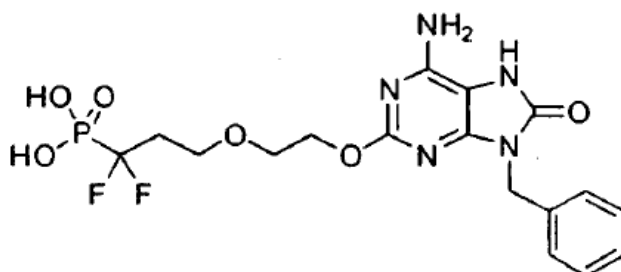


25

30

**Compuesto 28:** ácido (3-((6-amino-9-bencil-8-oxo-8,9-dihidro-7H-purin-2-il)oxi)propil)fosfónico

35

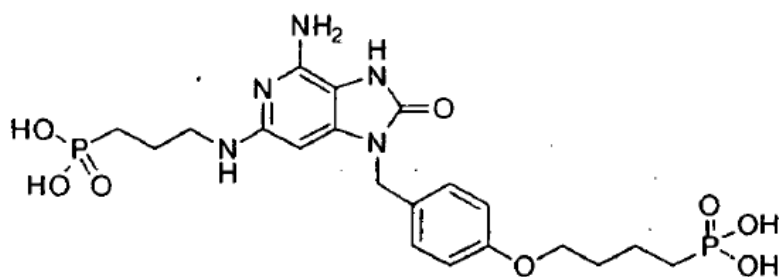


40

45

**Compuesto 29:** ácido (3-(2-((6-amino-9-bencil-8-oxo-8,9-dihidro-7H-purin-2-il)oxi)etoxi)-1,1-difluoropropil)fosfónico

50



55

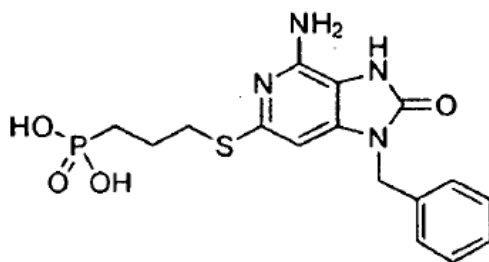
60

**Compuesto 30:** ácido (3-((4-amino-1-(4-(butiloxifosfonato)bencil)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-imidazo[4,5-c]piridin-6-il)amino)propil)fosfónico

65

5

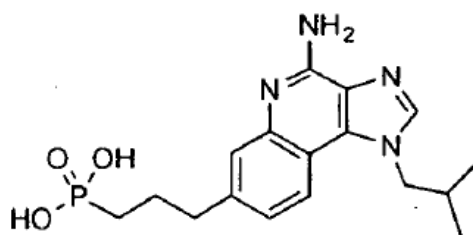
10



15 **Compuesto 31:** ácido (3-((4-amino-1-bencil-2-oxo-2,3-dihidro-1H-imidazo[4,5-c]piridin-6-il)tio)propil)fosfónico

20

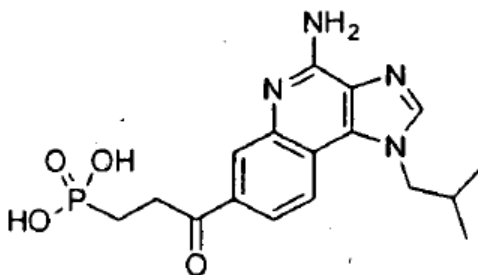
25



30 **Compuesto 32:** ácido (3-(4-amino-1-isobutil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-7-il)propil)fosfónico

35

40

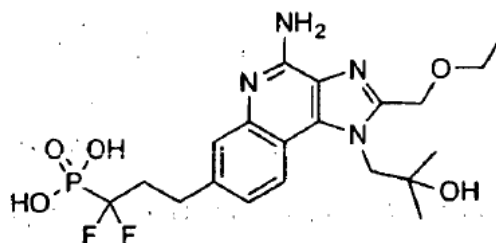


45

**Compuesto 33:** ácido (3-(4-amino-1-isobutil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-7-il)-3-oxopropil)fosfónico

50

55



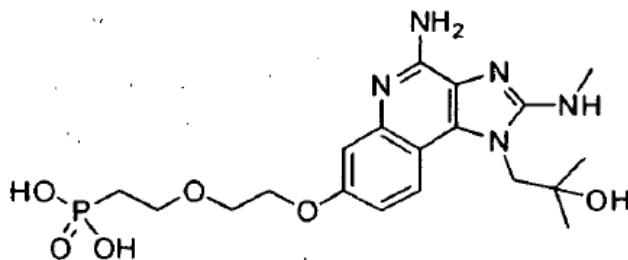
60

**Compuesto 34:** ácido (3-(4-amino-2-(etoximetil)-1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-7-il)-1,1-difluoropropil)fosfónico

65

5

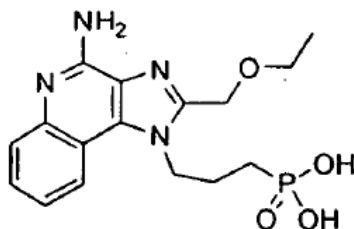
10



15 **Compuesto 35:** ácido (2-(2-((4-amino-1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-2-(metilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-7-il)oxi)etoxi)etil)fosfónico

20

25

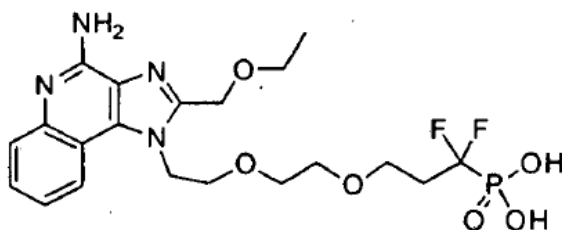


30

**Compuesto 36:** ácido (3-(4-amino-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)propil)fosfónico

35

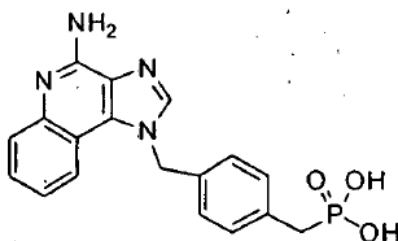
40



45 **Compuesto 37:** ácido (3-(2-(2-(4-amino-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)etoxi)etoxi)-1,1-difluoropropil)fosfónico

50

55

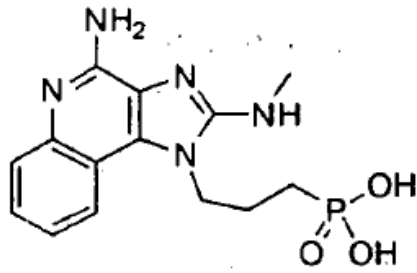


60 **Compuesto 38:** ácido (4-((4-amino-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)metil)encil)fosfónico

65

5

10

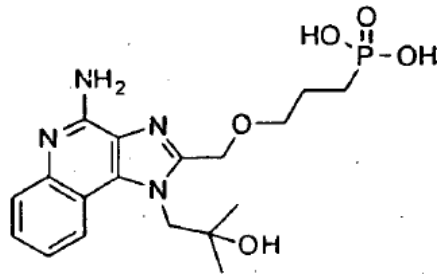


15

**Compuesto 39:** ácido (3-(4-amino-2-(metilamino)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)propil)fosfónico

20

25

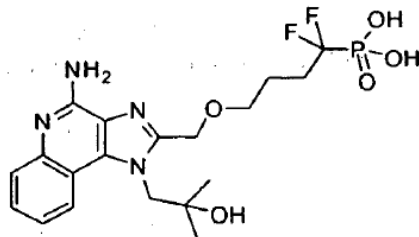


30

**Compuesto 40:** ácido (3-((4-amino-1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il)metoxi)propil)fosfónico

35

40

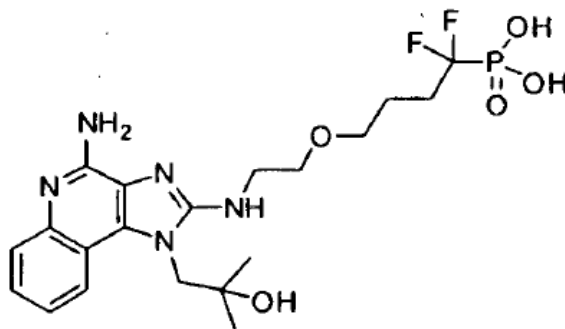


45

**Compuesto 41:** ácido (4-((4-amino-1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il)metoxi)-1,1-difluorobutil)fosfónico

50

55



60

**Compuesto 42:** ácido (4-(2-((4-amino-1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-il)amino)etoxi)-1,1-difluorobutil)fosfónico

65

5

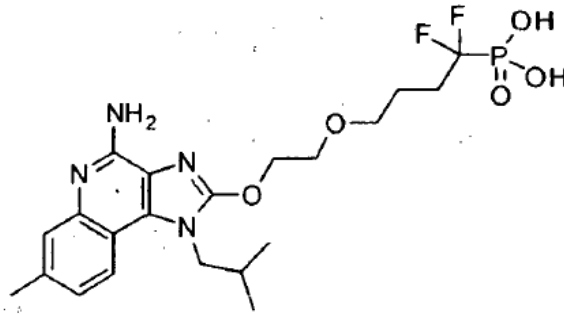
10

15

**Compuesto 43:**  
difluorobutil)fosfónico

ácido

(4-(2-((4-amino-1-isobutil-7-metil-1H-imidazo(4,5-c)quinolin-2-il)oxi)etoxi)-1,1-



20

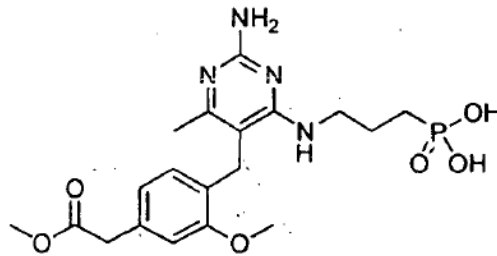
25

30

**Compuesto 44:**  
il)amino)propil)fosfónico

ácido

(3-((2-amino-5-(2-metoxi-4-(2-metoxi-2-oxoetil)bencil)-6-metilpirimidin-4-



35

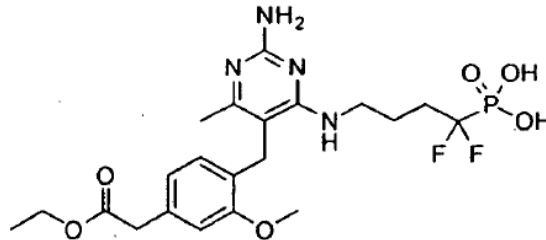
40

45

**Compuesto 45:**  
difluorobutil)fosfónico

ácido

(4-((2-amino-5-(4-(2-etoxi-2-oxoetil)-2-metoxibencil)-6-metilpirimidin-4-il)amino)-1,1-



50

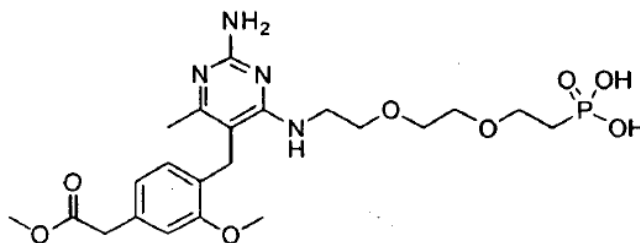
55

60

**Compuesto 46:**  
il)amino)etoxi)etoxi)etil)fosfónico

ácido

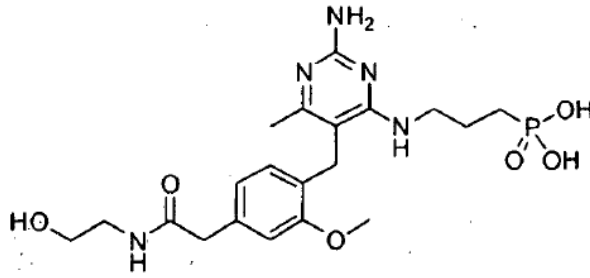
(2-(2-(2-((2-amino-5-(2-metoxi-4-(2-metoxi-2-oxoetil)bencil)-6-metilpirimidin-4-



65

5

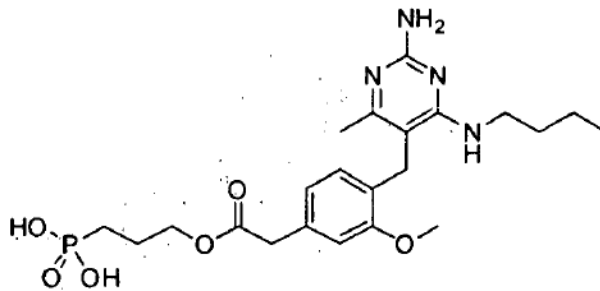
10



15 **Compuesto 47:** ácido (3-((2-amino-5-(4-(2-((2-hidroxi)etil)amino)-2-oxoetil)-2-metoxibencil)-6-metilpirimidin-4-il)amino)propil)fosfónico

20

25



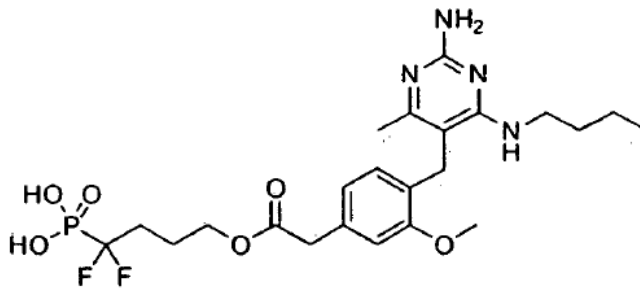
30

**Compuesto 48:** ácido (3-(2-(4-((2-amino-4-(butilamino)-6-metilpirimidin-5-il)metil)-3-metoxifenil)acetoxi)propil)fosfónico

35

40

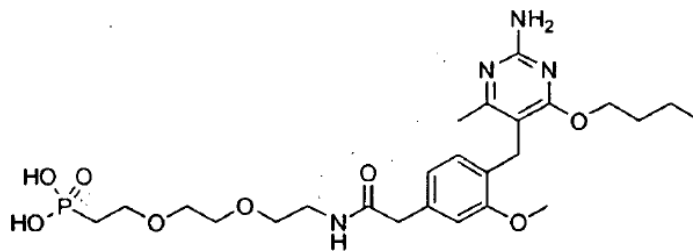
45



50 **Compuesto 49:** ácido (4-(2-(4-((2-amino-4-(butilamino)-6-metilpirimidin-5-il)metil)-3-metoxifenil)acetoxi)-1,1-difluorobutil)fosfónico

55

60



65

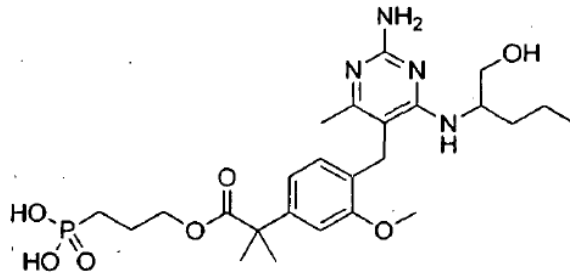
**Compuesto 50:** ácido (2-(2-(2-(2-(4-((2-amino-4-butoxi-6-metilpirimidin-5-il)metil)-3-metoxifenil)acetamido)etoxi)etoxi)etil)fosfónico

65



5

10

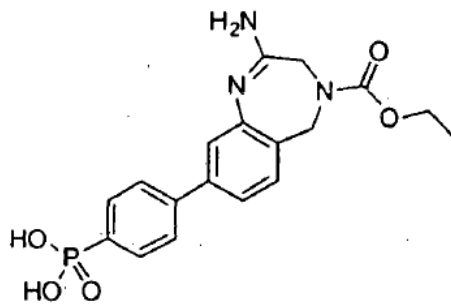


15

**Compuesto 51:** ácido (3-((2-(4-((2-amino-4-((1-hidroxipentan-2-il)amino)-6-metilpirimidin-5-il)metil)-3-metoxifenil)-2-metilpropanoil)oxi)propil)fosfónico

20

25

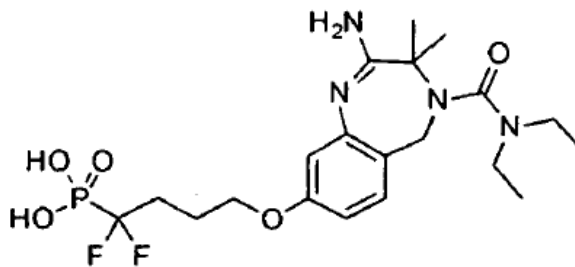


30

**Compuesto 52:** ácido (4-(2-amino-4-(etoxicarbonil)-4,5-dihidro-3H-benzo[e][1,4]diazepin-8-il)fenil)fosfónico

35

40

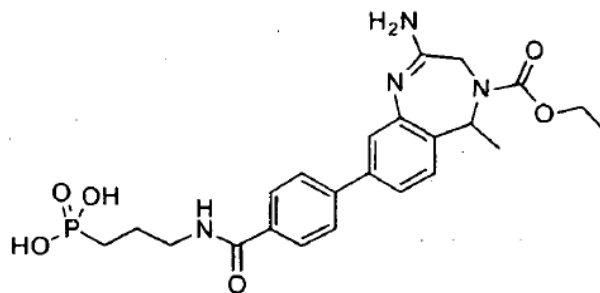


45

**Compuesto 53:** ácido (4-((2-amino-4-(diethylcarbamoil)-3,3-dimetil-4,5-dihidro-3H-benzo[e][1,4]diazepin-8-il)oxi)-1,1-difluorobutil)fosfónico

50

55

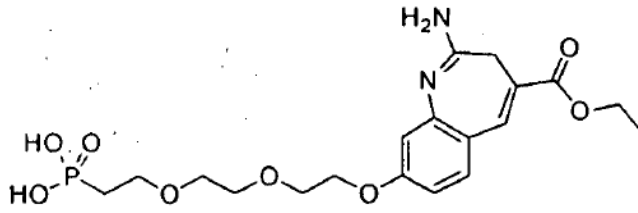


60

**Compuesto 54:** ácido (3-(4-(2-amino-4-(etoxicarbonil)-5-metil-4,5-dihidro-3H-benzo[e][1,4]diazepin-8-il)benzamido)propil)fosfónico

65

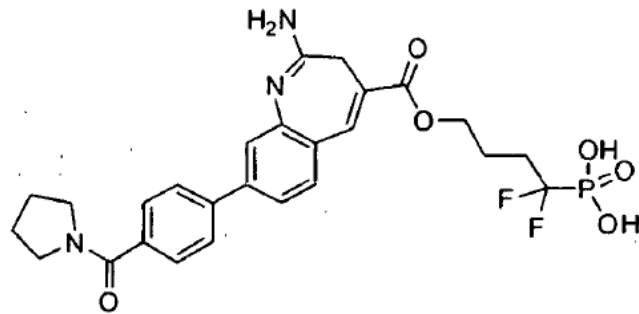
5



10

**Compuesto 55:** ácido (2-(2-(2-((2-amino-4-(etoxicarbonil)-3H-benzo[b]azepin-8-il)oxi)etoxi)etoxi)etil)fosfónico

15

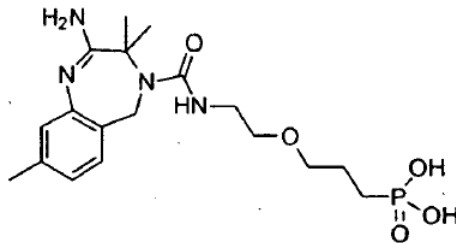


20

25

**Compuesto 56:** ácido (4-((2-amino-8-(4-(pirrolidina-1-carbonil)fenil)-3H-benzo[b]azepina-4-carbonil)oxi)-1,1-difluorobutil)fosfónico

30

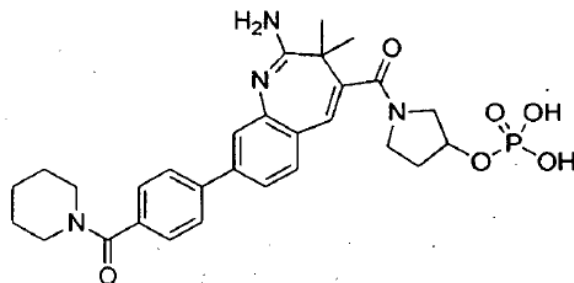


35

40

**Compuesto 57:** ácido (3-(2-(2-amino-3,3,8-trimetil-4,5-dihidro-3H-benzo[e][1,4]diazepina-4-carboxamido)etoxi)propil)fosfónico

45



50

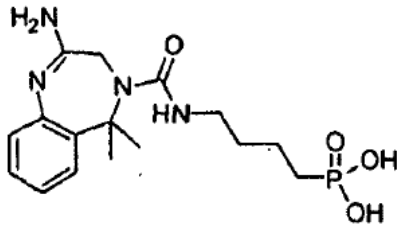
55

**Compuesto 58:** dihidrogenofosfato de 1-(2-amino-3,3-dimetil-8-(4-(piperidina-1-carbonil)fenil)-3H-benzo[b]azepina-4-carbonil)pirrolidin-3-ilo

60

65

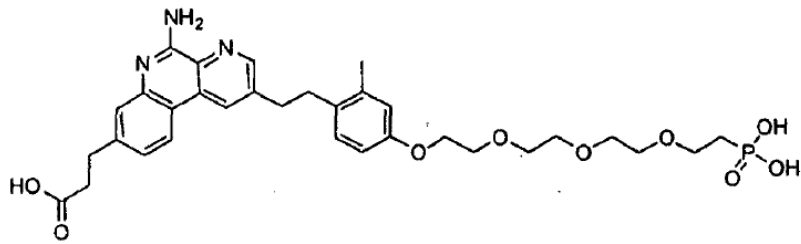
5



10

**Compuesto 59:** ácido (4-(2-amino-5,5-dimetil-4,5-dihidro-3H-benzo[e][1,4]diazepina-4-carboxamido)butil)fosfónico

15

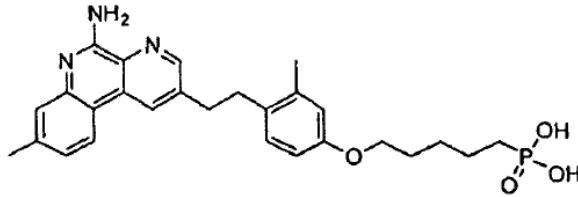


20

25

**Compuesto de Referencia 60:** ácido 3-(5-amino-2-(2-metil-4-(2-(2-(2-(2-fosfonoetoxi)etoxi)etoxi)etoxi)fenil)benzo[f][1,7]naftiridin-8-il)propanoico

30

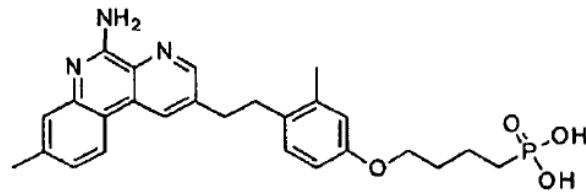


35

40

**Compuesto de Referencia 61:** ácido (5-(4-(2-(5-amino-8-metilbenzo[f][1,7]naftiridin-2-il)etil)-3-metilfenoxi)pentil)fosfónico

45

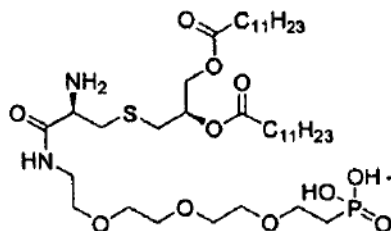


50

55

**Compuesto de Referencia 62:** ácido (4-(4-(2-(5-amino-8-metilbenzo[f][1,7]naftiridin-2-il)etil)-3-metilfenoxi)butil)fosfónico

60



65

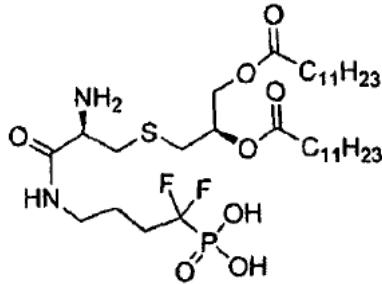
65

**Compuesto de Referencia 63:** ácido (14R,18R)-14-amino-18-(dodecanoiloxi)-13,21-dioxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12-azadotriacontil-fosfónico

5

10

15

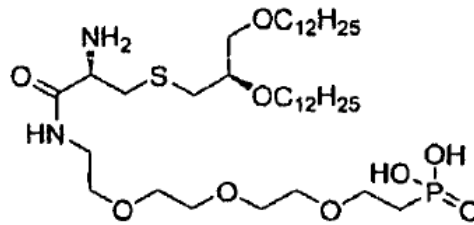


**Compuesto de Referencia 64:** ácido 4-((R)-2-amino-3-((R)-2,3-bis(dodecanoiloxi)propiltio)propanamido)-1,1-difluorobutil-fosfónico

20

25

30

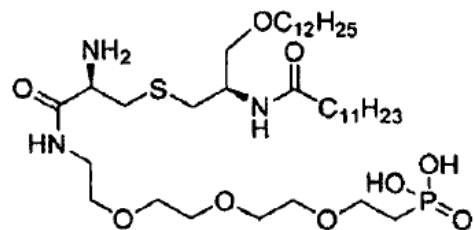


**Compuesto de Referencia 65:** ácido (14R,18R)-14-amino-18-(dodeciloxi)-13-oxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12-azadotriacontil-fosfónico

35

40

45

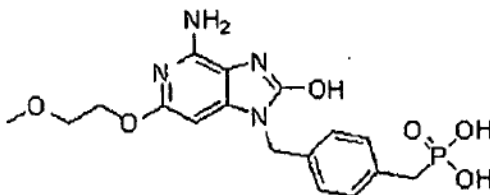


**Compuesto de Referencia 66:** ácido ((14R,18R)-14-amino-18-dodecanamido-13-oxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12-azadotriacontil)fosfónico

50

55

60



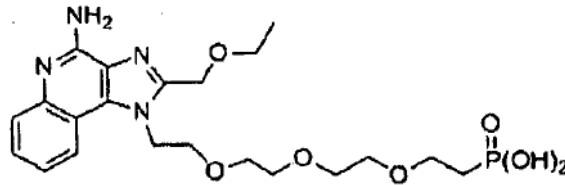
65

**Compuesto 67:** ácido (4-((A-amino-6-(2-metoxietoxi)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-

il)metil)bencil)fosfónico

5

10

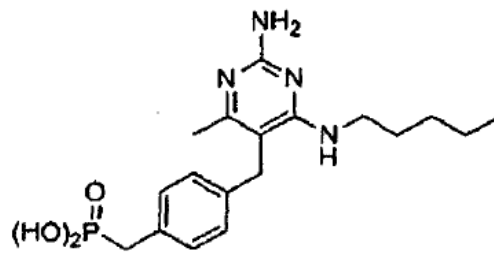


**Compuesto 68:** ácido (2-(2-(2-(2-(4-amino-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil))fosfónico

15

20

25

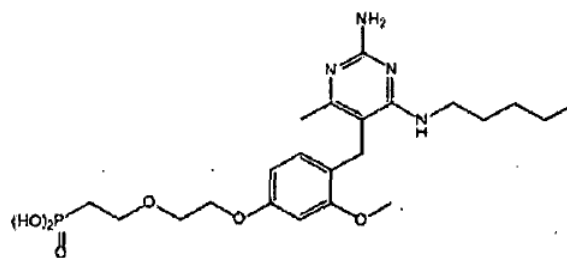


**Compuesto 69:** ácido (4-((2-amino-4-metil-6-(pentilamino)pirimidin-5-il)metil)bencil)fosfónico

30

35

40

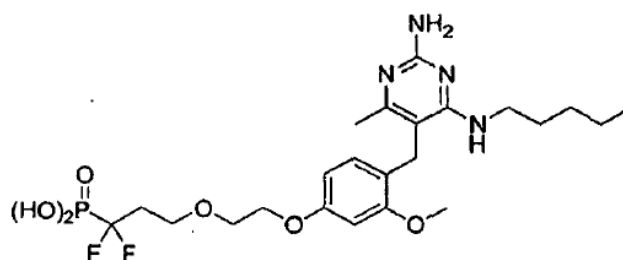


**Compuesto 70:** ácido (2-(2-(4-((2-amino-4-metil-6-(pentilamino)pirimidin-5-il)metil)-3-metoxifenoxi)etoxi)etil))fosfónico

45

50

55

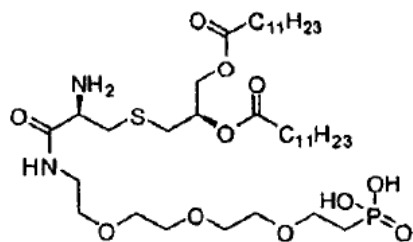


**Compuesto 71:** ácido (3-(2-(4-((2-amino-4-metil-6-(pentilamino)pirimidin-5-il)metil)-3-metoxifenoxi)etoxi)-1,1-difluoropropil)fosfónico

60

65

5

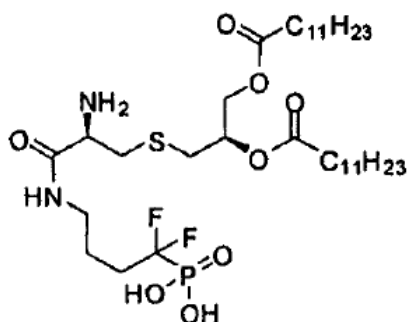


10

**Compuesto de Referencia 72:** ácido ((14R,18R)-14-amino-18-(dodecanoiloxi)-13,21-dioxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12-azadotriacontil)fosfónico

15

20



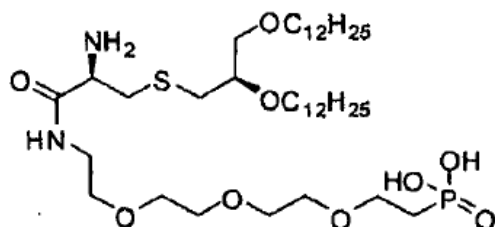
25

30

**Compuesto de Referencia 73:** ácido (4-((R)-2-amino-3-(((R)-2,3-bis(dodecanoiloxi)propil)tio)propanamido)-1,1-difluorobutil)fosfónico

35

40

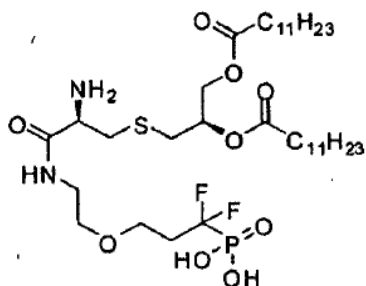


45

**Compuesto de Referencia 74:** ácido ((14R, 18R)-14-amino-18-(dodeciloxi)-13-oxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12-azadotriacontil)fosfónico

50

55

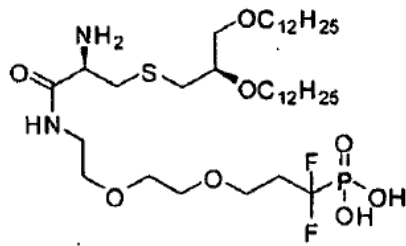


60

**Compuesto de Referencia 75:** ácido ((9R,13R)-9-amino-13-(dodecanoiloxi)-1,1-difluoro-8,16-dioxo-4,15-dioxa-11-tia-7-azaheptacosil)fosfónico

65

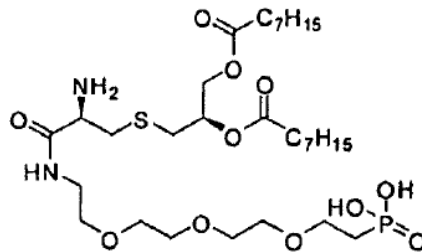
5



10

15 **Compuesto de Referencia 76:** ácido ((12R,16R)-12-amino-16-(dodeciloxi)-1,1-difluoro-11-oxo-4,7,18-trioxa-14-tia-10-azatriacontil)fosfónico

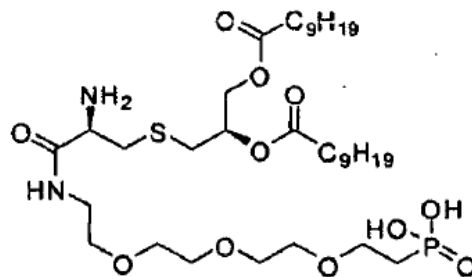
20



25

30 **Compuesto de Referencia 77:** ácido ((14R,18R)-14-amino-18-(octanoiloxi)-13,21-dioxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12-azaoctacosil)fosfónico

35



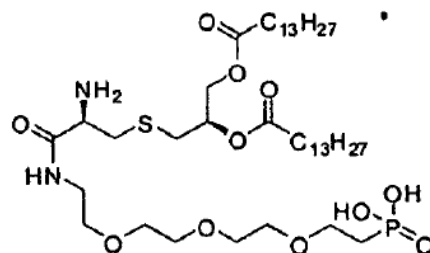
40

45

50 **Compuesto de Referencia 78:** ((14R,18R)-14-amino-18-(decanoiloxi)-13,21-dioxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12-azatriacontil)fosfónico

50

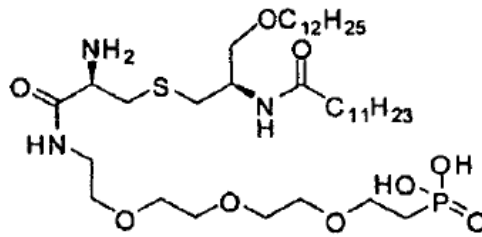
55



60

65 **Compuesto de Referencia 79:** ácido ((14R,18R)-14-amino-13,21-dioxo-18-(tetradecanoiloxi)-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12-azatetriacontil)fosfónico

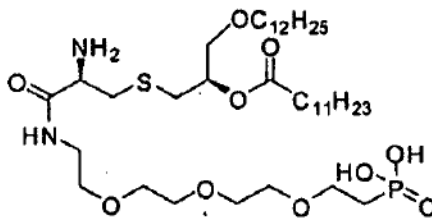
5



10

15 **Compuesto de Referencia 80:** ácido ((14R,18R)-14-amino-18-dodecanamido-13-oxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12-azadotriacontil)fosfónico

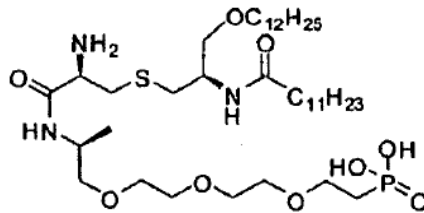
20



25

30 **Compuesto de Referencia 81:** ácido ((14R,18R)-14-amino-18-(dodecanoiloxi)-13-oxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12-azadotriacontil)fosfónico

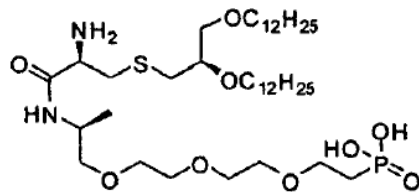
35



40

45 **Compuesto de Referencia 82:** ácido ((11S,14R,18R)-14-amino-18-dodecanamido-11-metil-13-oxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12-azadotriacontil)fosfónico

50



55

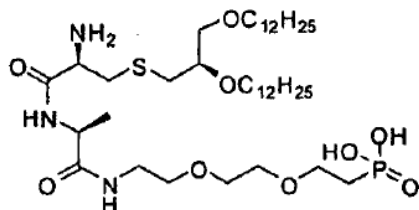
60 **Compuesto de Referencia 83:** ácido ((11S,14R,18R)-14-amino-18-(dodeciloxi)-11-metil-13-oxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12-azadotriacontil)fosfónico

60

65



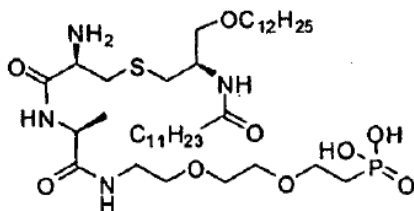
5



10

**Compuesto de Referencia 84:** ácido ((11S,14R,18R)-14-amino-18-(dodeciloxi)-11-metil-10,13-dioxo-3,6,20-trioxa-16-tia-9,12-diazadotriacontil)fosfónico

15

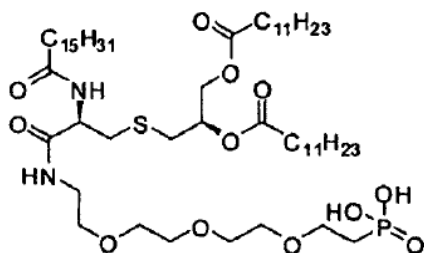


20

25

**Compuesto de Referencia 85:** ácido ((11S,14R,18R)-14-amino-18-dodecanamido-11-metil-10,13-dioxo-3,6,20-trioxa-16-tia-9,12-diazadotriacontil)fosfónico

30



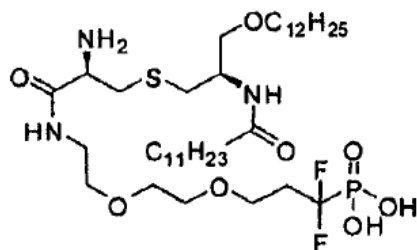
35

40

**Compuesto de Referencia 86:** ácido ((14R,18R)-18-(dodecanoiloxi)-13,21-dioxo-14-palmitamido-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12-azadotriacontil)fosfónico

45

50



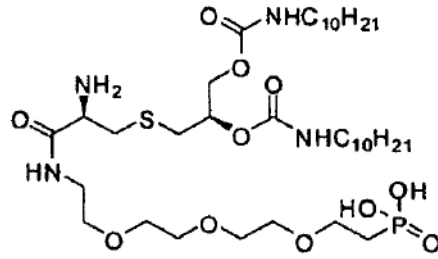
55

60

**Compuesto de Referencia 87:** ácido ((12R,16R)-12-amino-16-dodecanamido-1,1-difluoro-11-oxo-4,7,18-trioxa-14-tia-10-azatriacontil)fosfónico

65

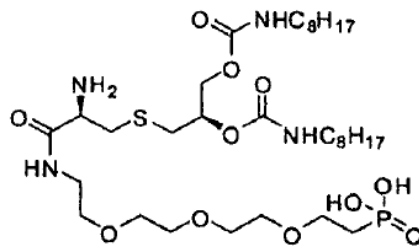
5



10

15 **Compuesto de Referencia 88:** ácido ((14R,18R)-14-amino-18-((decilcarbamoil)oxi)-13,21-dioxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12,22-diazadotriacontil)fosfónico

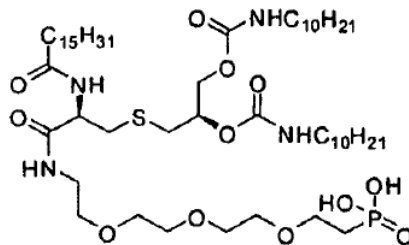
20



25

30 **Compuesto de Referencia 89:** ácido ((14R,18R)-14-amino-18-((octilcarbamoil)oxi)-13,21-dioxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12,22-diazatriacontil)fosfónico

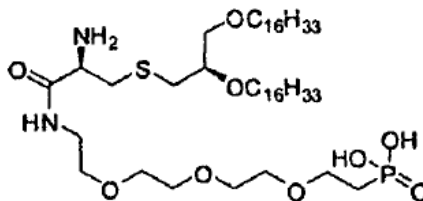
35



40

45 **Compuesto de Referencia 90:** ácido ((14R,18R)-18-((decilcarbamoil)oxi)-13,21-dioxo-14-palmitamido-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12,22-diazadotriacontil)fosfónico

50

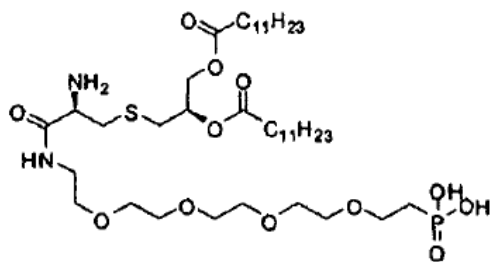


55

60 **Compuesto de Referencia 91:** ácido ((14R,18R)-14-amino-18-(hexadeciloxi)-13-oxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12-azahexatriacontil)fosfónico

65

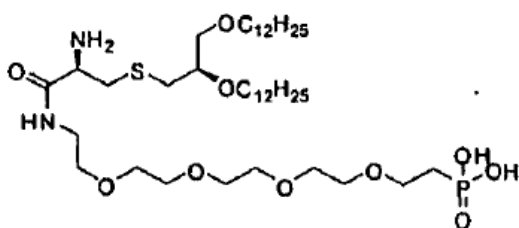
5



10

15 **Compuesto de Referencia 92:** ácido ((17R,21R)-17-amino-21-(dodecanoiloxi)-16,24-dioxo-3,6,9,12,23-pentaoxa-19-tia-15-azapentatriacontil)fosfónico

20

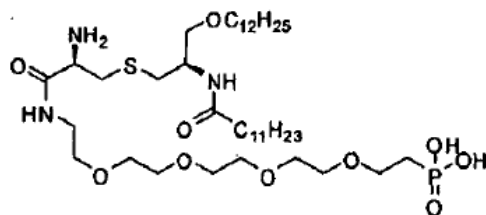


25

30 **Compuesto de Referencia 93:** ácido ((17R,21R)-17-amino-21-(dodeciloxi)-16-oxo-3,6,9,12,23-pentaoxa-19-tia-15-azapentatriacontil)fosfónico

30

35

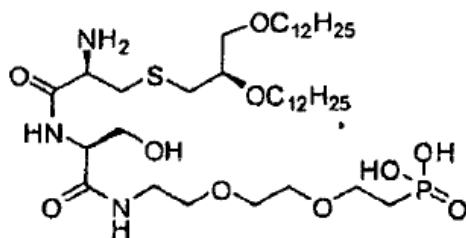


40

45 **Compuesto de Referencia 94:** ácido ((17R,21R)-17-amino-21-dodecanamido-16-oxo-3,6,9,12,23-pentaoxa-19-tia-15-azapentatriacontil)fosfónico

45

50

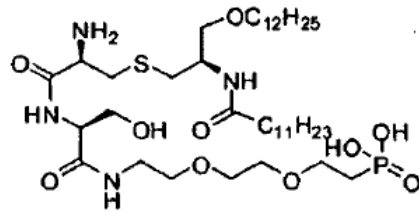


55

60 **Compuesto de Referencia 95:** ácido ((11S,14R,18R)-14-amino-18-(dodeciloxi)-11-(hidroximetil)-10,13-dioxo-3,6,20-trioxa-16-tia-9,12-diazadotriacontil)fosfónico

65

5

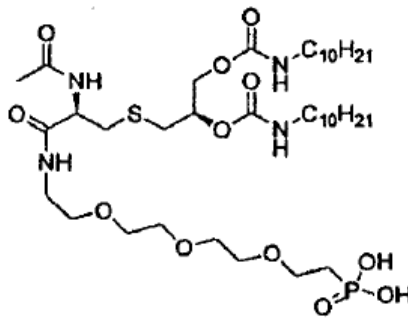


10

**Compuesto de Referencia 96:** ácido ((11S,14R,18R)-14-amino-18-dodecanamido-11-(hidroximetil)-10,13-dioxo-3,6,20-trioxa-16-tia-9,12-diazadotriacontil)fosfónico

15

20



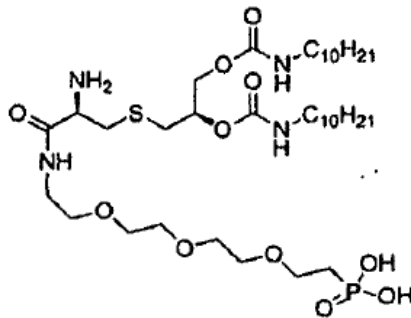
25

30

**Compuesto de Referencia 97:** ácido ((14R,18R)-14-acetamido-18-((decilcarbamoil)oxi)-13,21-dioxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12,22-diazadotriacontil)fosfónico

35

40

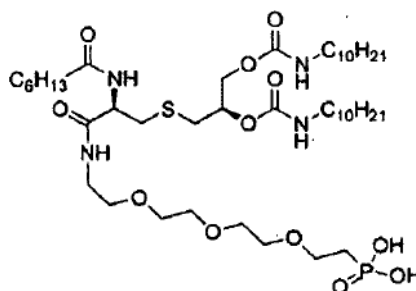


45

50

**Compuesto de Referencia 98:** ácido ((14R,18R)-14-amino-18-((decilcarbamoil)oxi)-13,21-dioxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12,22-diazadotriacontil)fosfónico

55



60

65

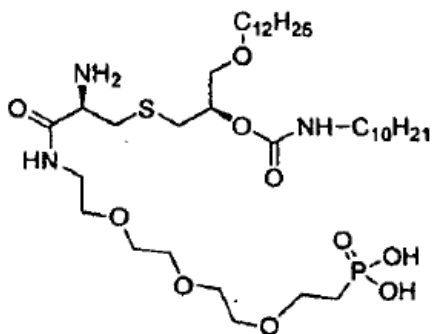
**Compuesto de Referencia 99:** ácido ((14R,18R)-18-((decilcarbamoil)oxi)-14-heptanamido-13,21-dioxo-3,6,9,20-

tetraoxa-16-tia-12,22-diazadotriacontil)fosfónico

5

10

15



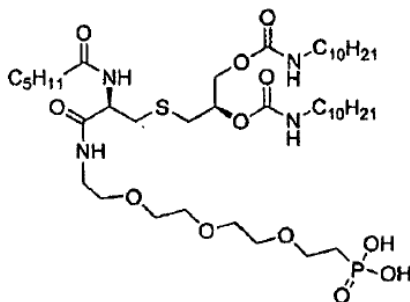
20

**Compuesto de Referencia 100:** ácido ((14R,18R)-14-amino-18-((dodeciloxi)metil)-13,20-dioxo-3,6,9,19-tetraoxa-16-tia-12,21-diazahentriacontil)fosfónico

25

30

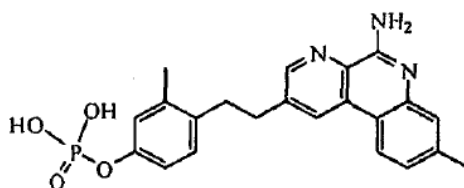
35



40

**Compuesto de Referencia 101:** ácido ((14R,18R)-18-((decilcarbamoil)oxi)-14-hexanamido-13,21-dioxo-3,6,9,20-tetraoxa-16-tia-12,22-diazadotriacontil)fosfónico

45



50

**Compuesto de Referencia 102:** dihidrogenofosfato de 4-(2-(5-amino-8-metilbenzo[f][1,7]naftiridin-2-il)etil)-3-metilfenilo

55

La descripción también proporciona una composición que comprende dos o más de dichos compuestos 1 a 62. La descripción también proporciona una composición que comprende dos o más de dichos compuestos 1 a 66. La descripción también proporciona una composición que comprende dos o más de dichos compuestos 1 a 102. Los compuestos 1 a 15, 23 a 51, 60 a 62, 67 a 71 y 102 son agonistas de TLR7 modificados con fósforo que son útiles con la invención.

60

Los compuestos 16 a 22, 63 a 66 y 72 a 101 son agonistas de TLR2 modificados con fósforo que son útiles con la invención.

Los **compuestos 52 a 59** son agonistas de TLR8 modificados con fósforo que son útiles con la invención.

65

**Grupos químicos**

Salvo que se defina específicamente en otra parte, los grupos químicos analizados en el presente documento tienen el siguiente significado cuando se utilizan en la presente memoria descriptiva:

El término "alquilo" incluye residuos de hidrocarburo saturado que incluyen:

- 5
- grupos lineales de hasta 10 átomos (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), o de hasta 6 átomos (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), o de hasta 4 átomos (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>). Los ejemplos de tales grupos alquilo incluyen, pero no se limitan, a C<sub>1</sub>- metilo, C<sub>2</sub> - etilo, C<sub>3</sub> - propilo y C<sub>4</sub> - n-butilo.
  - 10 - grupos ramificados de entre 3 y 10 átomos (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>), o de hasta 7 átomos (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), o de hasta 4 átomos (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>). Los ejemplos de tales grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, C<sub>3</sub> - iso-propilo, C<sub>4</sub> - sec-butilo, C<sub>4</sub> - iso-butilo, C<sub>4</sub> - terc-butilo y C<sub>5</sub> - neo-pentilo.

El término "alquilenio" se refiere al radical hidrocarburo divalente derivado de un grupo alquilo, y se interpretará según la definición anterior.

15 El término "alqueniilo" incluye residuos de hidrocarburo monoinsaturados que incluyen:

- grupos lineales de entre 2 y 6 átomos (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>). Los ejemplos de tales grupos alqueniilo incluyen, pero no se limitan a, C<sub>2</sub> - vinilo, C<sub>3</sub> - 1-propeniilo, C<sub>3</sub> - alilo, C<sub>4</sub> - 2-butenilo
- 20 - grupos ramificados de entre 3 y 8 átomos (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>). Los ejemplos de tales grupos alqueniilo incluyen, pero no se limitan a, C<sub>4</sub> -2-metil-2-propeniilo y C<sub>6</sub> - 2,3-dimetil-2-butenilo.

El término alqueniileno se refiere al radical hidrocarburo divalente derivado de un grupo alqueniilo, y se interpretará según la definición anterior.

25 El término "alcoxi" incluye residuos de hidrocarburo unidos a través del O que incluyen:

- grupos lineales de entre 1 y 6 átomos (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), o de entre 1 y 4 átomos (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>). Los ejemplos de tales grupos alcoxi incluyen, pero no se limitan a, alquilo C<sub>1</sub> - metoxi, C<sub>2</sub> - etoxi, C<sub>3</sub> - n-propoxi y C<sub>4</sub> - n-butoxi.
- 30 - grupos ramificados de entre 3 y 6 átomos (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) o de entre 3 y 4 átomos (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>). Los ejemplos de tales grupos alcoxi incluyen, pero no se limitan a, C<sub>3</sub> - iso-propoxi, y C<sub>4</sub> - sec-butoxi y terc-butoxi.

El halo está seleccionado de entre Cl, F, Br y I. El halo es preferentemente F.

35 El término "arilo" incluye un sistema de anillo aromático simple o condensado que contiene 6 ó 10 átomos de carbono; en el que, a menos que se indique lo contrario, cada aparición de arilo puede estar opcionalmente sustituida con hasta 5 sustituyentes seleccionados independientemente de entre alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), OH, halo, CN, COOR<sup>14</sup>, CF<sub>3</sub> y NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>; como se ha definido anteriormente. Por lo general, el arilo estará opcionalmente sustituido con 1, 2 ó 3 sustituyentes. Los sustituyentes opcionales están seleccionados de entre los indicados anteriormente. Los ejemplos de grupos arilo adecuados incluyen fenilo y naftilo (cada uno opcionalmente sustituido como se ha indicado anteriormente). Arileno se refiere al radical divalente derivado de un grupo arilo, y se interpretará según la definición anterior.

45 El término "heteroarilo" incluye un anillo aromático monocíclico o bicíclico de 5, 6, 9 ó 10 miembros, que contiene 1 ó 2 átomos de N y, opcionalmente, un átomo de NR<sup>14</sup>, o un átomo de NR<sup>14</sup> y un átomo de S o de O, o un átomo de S, o un átomo de O; en el que, a menos que se indique lo contrario, dicho heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido con 1, 2 ó 3 sustituyentes seleccionados independientemente de entre alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), OH, halo, CN, COOR<sup>14</sup>, CF<sub>3</sub> y NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup>; tal como se define más adelante. Los ejemplos de grupos heteroarilo adecuados incluyen tienilo, furanilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, tetrazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, indolilo, bencimidazolilo, benzotriazolilo, quinolinilo e isoquinolinilo (opcionalmente sustituido como se ha indicado anteriormente). Heteroarileno se refiere al radical divalente derivado de heteroarilo y se interpretarán según la definición anterior.

55 El término "heterociclilo" es un anillo monocíclico o bicíclico, no aromático, de 3 a 10 miembros unidos a través del C o unidos a través del N, en el que dicho anillo heterocicloalquilo contiene, cuando sea posible, 1, 2 ó 3 heteroátomos seleccionados independientemente de entre N, NR<sup>14</sup>, S(O)<sub>q</sub> y O; y dicho anillo heterocicloalquilo contiene opcionalmente, cuando sea posible, 1 ó 2 dobles enlaces, y está opcionalmente sustituido en el carbono con 1 ó 2 sustituyentes seleccionados independientemente de entre alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alcoxi (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), OH, CN, CF<sub>3</sub>, halo, COOR<sup>14</sup>, NR<sup>14</sup>R<sup>15</sup> y arilo.

60 En las definiciones anteriores, R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> están seleccionados independientemente de entre H y alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>).

65

5 Cuando una fórmula estructural se define con un sustituyente fijado al núcleo de la molécula mediante un enlace no especificado o "flotante", por ejemplo, como para el grupo P<sup>3</sup> en el caso de la fórmula (C), esta definición abarca la casos en los que el sustituyente no especificado está fijado a cualquiera de los átomos en el anillo en el que se encuentra el enlace flotante, mientras que se ajuste a la valencia permitida para ese átomo.

En el caso de los compuestos de la invención que pueden existir en formas tautómeras (es decir, en formas ceto o enol), por ejemplo los compuestos de fórmula (C) o (H), la referencia a un compuesto concreto incluye opcionalmente todas esas formas tautómeras.

## 10 **General**

15 El término "que comprende" abarca "incluido/a/os/as", así como "que consiste", por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

El término "prácticamente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "prácticamente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, el término "prácticamente" puede omitirse de la definición de la invención.

20 El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo,  $x \pm 10\%$ .

25 A menos que se indique específicamente, un proceso que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden de mezcla específico. Por lo tanto, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando haya tres componentes, entonces pueden combinarse entre sí dos componentes y, a continuación, puede combinarse la combinación con el tercer componente, etc.

30 Cuando se utilizan materiales animales (y especialmente bovinos) en el cultivo de células, deben obtenerse de fuentes que están libres de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), y, en particular, libres de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB). En general, resulta preferente cultivar las células en total ausencia de materiales derivados de animales.

35 Cuando un compuesto se administra al cuerpo como parte de una composición, entonces ese compuesto puede sustituirse, como alternativa, por un profármaco adecuado.

Cuando en lo anteriormente indicado se define una exclusión, los compuestos excluidos deben incluir al menos un resto adsorbente.

## 40 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Las figuras 1 a 4 muestran la concentración sérica ( $\mu\text{M}$ ) de los compuestos 2, 5, 1 y 3, ya sea libres o adsorbidos, durante un período de 24 horas después de la inyección intramuscular.

45 La figura 5 muestra los niveles musculares ( $\mu\text{M}$ ) de los compuestos 24 horas después de la inyección. El eje x muestra el número de compuesto; + indica la adsorción a Al-H, mientras que - indica la ausencia de Al-H. Cada barra representa un solo animal, conteniendo cada grupo 3 animales.

50 La figura 6 muestra el SDS-PAGE de una mezcla de antígenos de MenB. Las calles marcadas como "std" muestran los estándares de antígenos purificados a tres concentraciones. Los antígenos se formularon con Al-H solo o Al-H al que se había adsorbido el compuesto 1. "Sn" muestra el sobrenadante después de la adsorción; "Des" muestra los sobrenadantes después del tratamiento de desorción; "TCA" muestra los sobrenadantes después de la precipitación.

55 La figura 7 muestra los títulos de SBA contra la cepa NZ98 utilizando 5CVMB formulado con (a) Al-H solo, (b) Al-H + 25  $\mu\text{g}$  de compuesto 1, (c) Al-H + 100  $\mu\text{g}$  de compuesto 1, (d) compuesto 1 solo, o (e) Al-H y vesículas de membrana externa de MenB.

60 La figura 8 muestra los títulos de SBA contra NZ98 utilizando 5CVMB formulado (a) sin adyuvante, (b) con Al-H + OMV (vesículas de membrana externa), (c) con 100  $\mu\text{g}$  de compuesto 2, (d) con 25  $\mu\text{g}$  de compuesto 2 + Al-H, o (e) con 100  $\mu\text{g}$  de compuesto 2 + Al-H.

65 La figura 9 muestra los títulos de SBA contra NZ98 utilizando 5CVMB formulado (a) sin adyuvante, (b) con Al-H y vesículas, (c) con 100  $\mu\text{g}$  de compuesto 5, (d) con 25  $\mu\text{g}$  de compuesto 5 (e) 100  $\mu\text{g}$  de compuesto 5 + Al-H, o (f) 25  $\mu\text{g}$  de compuesto 5 + Al-H.

Las figuras 10 y 11 muestran el número de veces que aumentan, en comparación con el vehículo solo, las

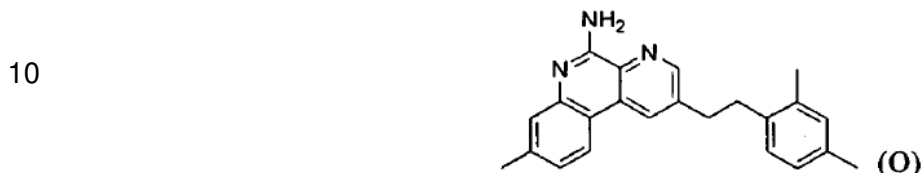
citocinas séricas después de la administración del compuesto 1 o del compuesto 2. Cada citocina muestra dos barras: la barra de la izquierda muestra los niveles después de recibir el compuesto adsorbido a Al-H, mientras que la barra de la derecha muestra los niveles después de recibir el compuesto solo.

- 5 La figura 12 muestra las estructuras de los compuestos 1, 2, 3, 4, 5 y 13.
- La figura 13 muestra la concentración ( $\mu\text{M}$ ) de compuesto 3 durante las 5 horas siguientes a la incubación con SIF ( $\diamond$ ), tampón (o) o una mezcla de plasma/tampón ( $\blacktriangle$ ).
- 10 La figura 14 muestra el grado de desorción (%) del compuesto 1 durante las 5 horas siguientes al tratamiento con fosfato de potasio 10 mM ( $\diamond$ ), 100 mM ( $\blacksquare$ ) o 500 mM ( $\Delta$ ).
- 15 La figura 15 muestra los títulos de neutralización contra VRS en ratones utilizando F del VRS/antígeno formulado (a) con Al-H, (b) con Al-H y 25  $\mu\text{g}$  de compuesto 2, (c) con Al-H y 25  $\mu\text{g}$  de un agonista de TLR4 diferente, (d) con Al-H y un agonista de TLR9 particulado que consiste en un oligonucleótido inmunostimulador en complejo con un oligopéptido policatiónico, o (e) sin adyuvante.
- 20 La figura 16 muestra los niveles séricos ( $\mu\text{M}$ ) a lo largo del tiempo (horas) del compuesto 74 después de una inyección i.m. de 100  $\mu\text{g}$ .
- 25 La figura 17A muestra los títulos totales de IgG en 6 instantes de tiempo después de la inmunización con hemaglutinina del virus de la gripe adyuvada con Al-H solo (círculos) o Al-H + compuesto 2 (cuadrados). Los instantes de tiempo los días 7, 11, 16 y 21 después de la primera dosis, a continuación los días 7 y 14 después de la segunda dosis. La figura 17B muestra los títulos de IgG 14 días después de la segunda dosis. El par de barras de la izquierda muestra los títulos cuando el adyuvante era Al-H solo, mientras que el par de barras de la derecha está en el grupo de Al-H/compuesto 2. En cada par, la barra de la izquierda muestra los títulos de IgG1 y la barra de la derecha muestra los títulos de IgG2a.
- 30 La figura 18 muestra los títulos de IgG específica para F en ratones utilizando Al-H con el compuesto 2 en las cantidades indicadas. Los datos marcados con (\*) utilizaron un agonista de TLR9 particulado a efectos comparativos.
- 35 La figura 19 muestra los títulos de IgG, después de 3 inyecciones intramusculares, contra (A) H1a-H35L (B) EsxAB (C) Sta006 (D) Sta011. En cada panel, los cuatro grupos son, de izquierda a derecha: adyuvante de Al-H solo, Al-H + compuesto 2; Combo-1 + Al-H; Combo-1 + Al-H + compuesto 2. El símbolo \* indica una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) contra el adyuvante solo. El símbolo \*\* indica una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) contra Combo-1 + Al-H
- 40 La figura 20 muestra el % de células CD40 positivas. Las líneas son: \* = LPS, X = Al-H y el compuesto 2, sometido a dilución en serie, triángulo = Al-H y compuesto 2, con dosis fija de  $\text{Al}^{+++}$ , y cuadrado = compuesto 2 soluble sin Al-H. (A) es un control negativo de medio solo. (B) es un control negativo de tampón solo cuando se ensaya el compuesto 2 soluble o de Al-H solo cuando se ensaya el compuesto 2 adsorbido. Los demás valores en el eje X son la cantidad de compuesto de ensayo.
- 45 La figura 21 muestra el % de células CD80 positivas. El formato es el mismo que en la figura 20
- La figura 22 muestra los cromatogramas del Al-H/compuesto 2 antes y después de la esterilización en autoclave.
- 50 La figura 23 muestra los niveles séricos (nM) a lo largo del tiempo (horas en el eje X) de los compuestos (A) 6 (B) 67 (C) 68 y (D) 71 después de la inyección intramuscular (100  $\mu\text{g}$ )
- 55 La figura 24 muestra los niveles musculares (nM en el cuádriceps) de los compuestos (A) 67 (B) 71 y (C) 68 después de la inyección intramuscular de 100  $\mu\text{g}$  de compuesto 24 horas antes cuando estaba adsorbido a Al-H. Las flechas muestran la ausencia de niveles detectables de compuestos no adsorbidos.
- 60 La figura 25 muestra la activación de linfocitos B (% de células  $\text{CD19}^+$  que son  $\text{CD69}^+$ ) en respuesta a los compuestos 67 (b y e), 68 (c y f) y 71 (d y g) cuando se administran con tampón de histidina (solubles; b, c y d) o con Al-H (adsorbidos, e, f y g). Se utilizó resiquimod como control positivo (h), y el tampón solo como control negativo (a). Para los a-h, la barra de la izquierda muestra las células en los ganglios linfáticos inguinales y la barra de la derecha muestra las células del bazo.
- 65 La figura 26 muestra los títulos de IgG específica para gp140 el día 35 después de las inmunizaciones de los días 0 y 21. Los adyuvantes fueron (A) no adyuvado; (B) Al-H, (C) Al-H + un agonista de TLR4, (D) compuesto 2 adsorbido a Al-H, (E) emulsión de MF59.



**MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION*****Benzonaftiridinas modificadas con fósforo***

5 Se prepara el compuesto "O", un agonista de TLR7 útil, como se describe en el ejemplo 48 de la referencia  
4.



15 Se realizan diversas modificaciones a este compuesto de benzonaftiridina "precursor" para mejorar sus  
propiedades fisicoquímicas, y en particular para aumentar su solubilidad en agua y conferirle la capacidad de  
adsorberse al adyuvante de hidróxido de aluminio, garantizando así la administración *in vivo* de manera controlada  
con una persistencia prolongada en el sitio de la inyección. Con esta intención, se sintetizan los compuestos  
denominados anteriormente compuestos 1-15 y 60-62 como se describe en la referencia 10 (véase también la  
20 referencia 72).

25 Los compuestos de ejemplo 1, 2, 3, 4, 5 y 13 (figura 12) incluyen un grupo fosfonato fijado al anillo de fenilo  
del compuesto O a través de conectores de etilenglicol. El fosfonato proporciona un grupo que podría experimentar  
intercambio de ligandos con una sal de aluminio, mientras que los conectores de etilenglicol aumentan la solubilidad  
en agua de los compuestos. Los compuestos 2, 3, 4 y 5 incluyen adicionalmente un resto carboxilo que también  
sirve para mejorar la solubilidad en agua. El fosfonato en los compuestos 1, 3, 4 y 5 incluye dos sustituyentes fluoro  
electronegativos en el carbono  $\alpha$ , con el objetivo de mejorar la solubilidad.

30 El compuesto de ejemplo 102 incluye un grupo fosfato fijado al anillo de fenilo del compuesto O. El fosfato  
proporciona un grupo que podría experimentar intercambio de ligandos con una sal de aluminio. El compuesto 102  
se sintetiza como se describe en la referencia 10.

***Estudios de adsorción - hidróxido de aluminio***

35 La adsorción de los compuestos a hidróxido de aluminio (Al-H) se estudia a diversos pH.

40 Se disuelve compuesto 13 (0,5 mg/ml) en NaOH 10 mM (pH 6,5 o pH 9) y se añade al adyuvante de  
hidróxido de aluminio (2 mg/ml), lo que da como resultado una formulación de 100  $\mu$ g/dosis. Se evalúa el  
sobrenadante con HPLC utilizando un gradiente balístico (desde CH<sub>3</sub>CN al 10%-TFA al 0,1% hasta CH<sub>3</sub>CN al  
100%-TFA al 0,1% en 2,5 minutos) en una columna ACE C18 (50 cm x 4,6 mm) a 45°C. Para evaluar el efecto de la  
temperatura del sobrenadante y del tiempo de incubación sobre la unión, se evalúa el sobrenadante a temperatura  
ambiente y a 37°C después de 1 hora, 5 horas y 24 horas. También se evalúa un control sin hidróxido de aluminio.  
Los cromatogramas de HPLC para formulaciones del compuesto 1 con y sin hidróxido de aluminio, a cualquiera de  
las temperaturas, y a cualquiera de los pH, muestran que el compuesto 1 no está presente en el sobrenadante en  
ningún instante de tiempo cuando está presente el hidróxido de aluminio, lo que sugiere que se ha adsorbido a la sal  
45 metálica.

50 Se ensaya el compuesto 12 (1 mg/ml) de la misma manera a pH 9. El compuesto 12 también se ensaya a  
pH 6,7 en tampón de histidina 10 mM. De nuevo, el compuesto 10 no está presente en el sobrenadante cuando se  
incluye hidróxido de aluminio en la formulación, a cualquiera de los pH y a cualquiera de las temperaturas.

55 Se utiliza un método de extracción en disolvente orgánico para evaluar si el compuesto 13 se une  
covalentemente al hidróxido de aluminio. La formulación se prepara de la siguiente manera: 2 mg/ml de hidróxido de  
aluminio, 100  $\mu$ g/dosis de compuesto 13, tampón de histidina 10 mM; ajustar el pH a 9. También se prepara una  
formulación de control sin hidróxido de aluminio. Se mezcla 1 ml de la formulación con 1 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M a pH 9  
(concentración final 0,5 M, pH 9) y se deja en agitación suave durante toda la noche a 37°C. Si el compuesto se  
adsorbe a la sal de aluminio por intercambio de ligandos, entonces los aniones de fosfato libres lo desplazarán. A  
continuación se lleva a cabo la extracción orgánica: se mezcla 1 ml de cada muestra con 1 ml de n-butanol y se agita  
en vórtex.

60 Después de la formación de 2 fases, se recupera la fase superior (butanol), se seca con N<sub>2</sub> y se  
resuspende en MeOH/NaOH 10 mM. Se realiza el análisis mediante HPLC para los sobrenadantes de la formulación  
y para las muestras extraídas con butanol (columna C18; 0%-100% de B en 2 minutos; A = TFA al 0,1% en H<sub>2</sub>O,  
B = TFA al 0,1% en ACN). Se observan cantidades aumentadas de compuesto 13 en el sobrenadante de la  
65 formulación tratada con KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, lo que indica el desplazamiento del compuesto 13 por los aniones fosfato, es decir,  
la desorción.

También se evalúa y cuantifica la adsorción de los compuestos 1, 2, 3, 4, 5 (y también de compuestos adicionales 6, 67, 68 y 71 que se describe más adelante) en tampón de histidina 10 mM, pH 6,5. Estos compuestos son hidrosolubles a  $> 1$  mg/ml y la adsorción a Al-H es la siguiente:

5

compuesto	1	2	3	4	5	6	67	68	71
%	98,2%	97,0%	96,2%	96,0%	94,5%	88%	82%	94%	85%

10

A diferencia de la alta proporción de adsorción observada con estos compuestos modificados con fósforo, el compuesto O "precursor" no se adsorbe al adyuvante de Al-H.

15

El fosfocompuesto 1 es intrínsecamente fluorescente. La microscopía confocal del adyuvante de Al-H (3 mg/ml) antes y después de la mezcla con el compuesto 1 (0,25 mg/ml) muestra visualmente que el fosfocompuesto se asocia con partículas de la sal metálica insoluble. La citometría de flujo con el compuesto 2 muestra resultados similares: el compuesto O se observa como una población separada en presencia del Al-H, mientras que el compuesto 2 se co-localizan con el Al-H.

20

Se utiliza un protocolo de desorción para confirmar adicionalmente la unión de los fosfocompuestos al Al-H. Se trata la formulación compuesto/Al-H (fluorescente) con tampón de fosfato 0,5 M y a continuación se lava con agua (para los compuestos hidrosolubles) o con butanol (para los compuestos poco hidrosolubles). A continuación se analiza el Al-H lavado y, al igual que el Al-H antes de haber sido mezclado con un fosfocompuesto, no presenta fluorescencia.

25

Los estudios de estabilidad muestran que los compuestos adsorbidos son estables durante varias semanas, tanto en términos de adsorción como de estabilidad del compuesto. Los compuestos 1, 2, 3, 4, 5 y 13 presentan al menos un 95% de adsorción durante al menos un período de 3 semanas. La continuación del estudio de los compuestos 2 y 5 demuestra que son estables durante 6 semanas o más. La continuación de los estudios de RP-HPLC del compuesto 2 con Al-H, incluso en presencia de antígenos 5CVMB (véase más adelante), demostraron que los antígenos y el agonista de TLR7 permanecían adsorbidos de manera estable sin degradación durante al menos 24 semanas en condiciones acuosas a 4°C, o durante al menos 4 semanas a 37°C. La osmolaridad y el pH también se mantuvieron dentro de los intervalos aceptables durante el período de almacenamiento.

35

La figura 14 muestra la desorción del compuesto 1 almacenado a 100°C, pH 7, durante un máximo de 5 horas. La desorción comienza rápidamente, aumentando los niveles de fosfato de potasio (10 mM, 100 mM, 500 mM) que conducen a un aumento de la desorción (20%, 60%, 80%) al cabo de una hora, pero sin aumentar mucho más al cabo de 5 horas. A una concentración de fosfato 10 mM,  $> 70\%$  del compuesto permanece unido al cabo de 5 horas a 100°C, y  $> 80\%$  permanece unido al cabo de 5 horas a 70°C.

40

Se ensayaron diversos aniones tampón para la desorción del compuesto 1, utilizando la fluorescencia intrínseca y HPLC para seguir el compuesto. Como era de esperar, el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5 M, pH 9) era capaz de desorber completamente el compuesto 1 del Al-H. Se observó una ligera reducción de la unión (desorción parcial) con glutamato, ascorbato y citrato. Por el contrario, el NaCl y el Tris-HCl no cambiaron la adsorción; ni tampoco lo hicieron el sulfato de sodio ni el HEPES, ni el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH 7.

45

Se ensayó el compuesto 102 para determinar la adsorción al Al-H. *Método:* 1. *Solución de compuesto 2:* se disolvieron 2 mg del compuesto en 2 ml de agua para preparar una solución de 1 mg/ml. En resumen, se añadieron 2 ml de agua a 2 mg de compuesto 2 y se expuso a ultrasonidos la suspensión durante 10 minutos. Se añadió NaOH 1 N en incrementos de 2  $\mu\text{l}$  hasta que la solución se volvió transparente; se añadieron un total de 12  $\mu\text{l}$  de NaOH 1 N. Se determinó que el pH final de la solución, utilizando una tira indicadora de pH, era aproximadamente 10. La solución se expuso a ultrasonidos durante 5 minutos más y se mantuvo a temperatura ambiente. 2. *Adsorción a alumbre:* se prepararon muestras de adsorción a alumbre con 3 mg/ml de hidróxido de aluminio y 0,5 mg/ml de compuesto 2 sin un tampón. a) *Parte experimental:* 303  $\mu\text{l}$  de agua + 197  $\mu\text{l}$  de hidróxido de aluminio (15,22 mg/ml, lote 1050) + 500  $\mu\text{l}$  de 1 mg/ml de compuesto 2, agitar a temperatura ambiente durante toda la noche. b) *Control:* 500  $\mu\text{l}$  de agua + 500  $\mu\text{l}$  de 1 mg/ml de compuesto 2, agitar a temperatura ambiente durante toda la noche. *Resultados:* 1) *Visual:* Tras la adición del compuesto 2 para el vial experimental, la suspensión se volvió blanquecina y turbia, similar a lo observado con los fosfonatos y fluorofosfonatos (compuestos 2 y 5). 2) *RP-HPLC:* la adsorción y la recuperación se determinaron mediante RP-HPLC. Los estándares utilizados fueron 400  $\mu\text{g/ml}$ , 40  $\mu\text{g/ml}$  y 4  $\mu\text{g/ml}$ ; la Pendiente fue Área = 18000 x Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ). a) *Eficacia de adsorción:* se analizó el sobrenadante diluido 10 veces. i) *Parte experimental:* Área = 133708; Concentración (1x) = 74,3  $\mu\text{g/ml}$ ; Eficacia = 85,1%. ii) *Control:* Área = 923681; Concentración (1x) = 513,2  $\mu\text{g/ml}$ ; Eficacia = -2,6% (equivalente al 0%). b) *Recuperación:* sobrenadante diluido 10 veces después de ebullición con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5 M (pH 9). i) *Parte experimental:* Área = 931578; Concentración (1x) = 517,5  $\mu\text{g/ml}$ ; Recuperación = 103,5%. ii) *Control:* Área = 870826; Concentración (1x) = 483,8  $\mu\text{g/ml}$ ; Recuperación = 96,8%. *Conclusiones:* el compuesto 102 modulador de TLR7 que contiene fosfato se adsorbe a hidróxido de aluminio con una eficacia de adsorción  $> 80\%$  para administrar dosis de

65

50 µg en un volumen de inyección de 100 µl.

Potencial zeta

5 Se midió la carga superficial de las partículas de Al-H (2 mg/ml) en ausencia de compuesto 2, o con concentraciones crecientes desde 10 µg-200 µg. La medición del potencial zeta se basa en la dispersión de la luz de los sistemas particulados. Las formulaciones se prepararon en tampón de histidina 10 mM con NaCl, a continuación se diluyeron 1:10 en tampón de formulación. Los resultados fueron los siguientes:

10

Compuesto 2 (µg)	potencial Z (mV)	% de adsorción
0	+20±2	-
10	+23,5±0,6	100
25	+17±1	100
50	+10,6±0,7	100
100	-11,5±0,8	100
150	-28,9±0,1	99
200	-41±2	98,8

15

20

25

Por lo tanto la carga neta de las partículas de Al-H disminuye a medida que se añade el SMIP, invirtiéndose la polaridad entre los 50 µg y 100 µg de SMIP. Esto demuestra que el SMIP se está asociando con las partículas de Al-H y modifica la carga superficial de la sal de aluminio.

30

Una carga negativa neta con 100 µg de SMIP no excluye la posibilidad de que la superficie de Al-H tenga regiones con una carga positiva parcial. Tales regiones pueden estar disponibles para la adsorción de antígeno mediante mecanismos basados en la carga.

**Estudios de adsorción - fosfato de aluminio (Ejemplo de referencia)**

35

También se estudia la adsorción de los compuestos 1, 2 y 5 a un adyuvante de fosfato de aluminio (Al-P). El adyuvante de Al-P es químicamente una sal hidroxifosfato con una relación molar PO<sub>4</sub>/Al de aproximadamente 0,9 y un PZC de aproximadamente 5,7. El adyuvante se ensaya de manera "normal" o después del pretratamiento con concentraciones crecientes de tampón de fosfato (10 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM y 500 mM) en un intento de saturar los sitios de adsorción en el adyuvante. La incubación se realizó durante 8 horas en tampón de histidina 10 mM con 0,4 mg/ml del compuesto y 3 mg/ml de Al-P.

40

Los resultados son los siguientes, que muestran el % de adsorción para dos experimentos por compuesto:

45

	Pretratamiento con tampón de fosfato (mM)					
	0	10	50	100	250	500
Comp. 1	91,6	84,2	21,4	10,1	17,1	14,6
Comp. 1		85,3	8,7	10,9	14,5	18,2
Comp. 2	97,4	92,3	81,6	61,6	51,9	67,5
Comp. 2		94,0	81,5	59,2	52,0	62,2
Comp. 5	60	0,4	5,9	0,0	1,8	0,0
Comp. 5		0,0	2,4	0,0	2,0	0,0

50

55

Por lo tanto, los compuestos 2 y 5 se adsorben al Al-P con gran eficacia (> 90%) mientras que el compuesto 5 se adsorbe con una eficacia menor (60%). El pretratamiento del Al-P con solución de fosfato inhibe la adsorción de todos los compuestos, y el grado de adsorción depende de la concentración de fosfato en la solución de pretratamiento. Para el compuesto 5, es suficiente de una solución de Pi 10 mM para inhibir completamente la adsorción, mientras que para el compuesto 1, una solución 50 mM reduce la adsorción a un 20% y para el compuesto 2, una solución 100 mM reduce la adsorción a aproximadamente un 60%.

60

Los distintos experimentos con el compuesto 1 demostraron que el pretratamiento de un adyuvante de fosfato de aluminio con fosfato de potasio 10 mM reducía la adsorción de un 79,8% a un 23,5%, y que el pretratamiento con 50 mM ó 100 mM inhibía completamente la adsorción.

**Estudios de adsorción - fosfato de calcio (Ejemplo de referencia)**

65

Se estudió la adsorción del compuesto 2 a un adyuvante de fosfato de calcio disponible en el mercado a pH 6,4, sin tampón de histidina. Se preparan dos formulaciones, ambas con 1,12 mg/ml de Ca<sup>++</sup>, pero con 0,25 mg/ml o

con 0,125 mg/ml del compuesto 2. La adsorción fue de aproximadamente un 90% para ambas formulaciones.

### Esterilización en autoclave (Ejemplo de referencia)

5 El compuesto 2 se adsorbió a Al-H y se analizó mediante HPLC antes y después de la esterilización en autoclave. La figura 22 muestra que no hay ningún cambio en el perfil cromatográfico. También se utilizó la espectrometría de masas y tampoco hubo ningún cambio en los picos de EM en el material previamente y posteriormente esterilizado en autoclave. Por lo tanto los SMIP pueden esterilizarse en autoclave, incluso cuando se encuentran adsorbidos.

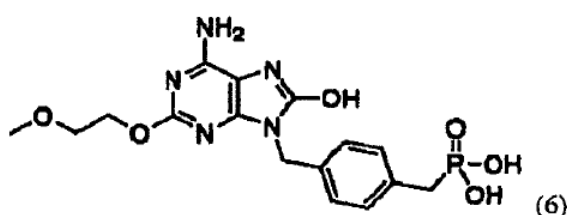
10

### Fórmula (c) - compuestos de adenina

Se sintetiza el siguiente fosfocompuesto, en base a los compuestos de adenina precursores descritos en las referencias 3, 11-17, 21 y 23-25 (en particular, las referencias 3 y 24):

15

20

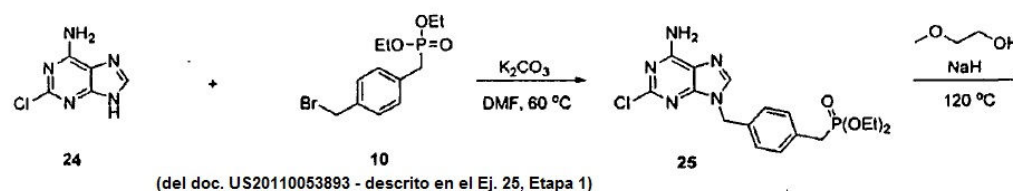


25

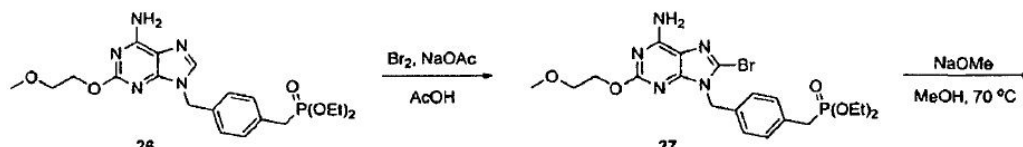
El compuesto 6 puede sintetizarse según el esquema que se muestra a continuación, los números de referencia se refieren a los compuestos que se muestran en el siguiente esquema, y no en relación a la numeración de compuestos establecida en otra parte de la presente solicitud. El compuesto identificado con el número de referencia 29 en el siguiente esquema es el compuesto 6 de la invención.

30

35

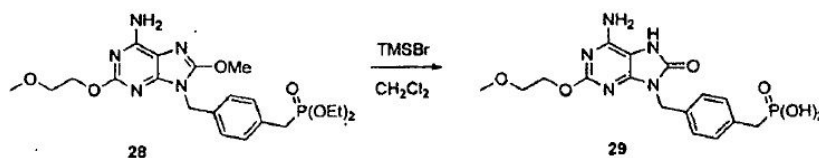


40



45

50



55

Con respecto al esquema anterior, la alquilación de la adenina **24**, disponible en el mercado, con bromuro de bencilo 10 (descrito en la referencia 88, Ej. 25, Etapa 1) proporciona el compuesto intermedio **25**. A continuación, se sustituye el cloruro de arilo de **25** con 2-metoxietanol para proporcionar el compuesto intermedio **26**. La bromación de **26** proporciona a continuación el compuesto intermedio **27**. A continuación, el tratamiento de **27** con metóxido de sodio proporciona **28**. A continuación, se hidroliza el compuesto intermedio **28** con bromotrimetilsilano para dar el ácido fosfónico **29**.

60

Los detalles experimentales de la síntesis anterior del compuesto 6 son los siguientes.

#### Etapa 1: 4-((6-amino-2-cloro-9H-purin-9-il)metil)bencilfosfonato de dietilo

65

A una solución de 2-cloro-9H-purin-6-amina, disponible en el mercado, (1 equiv.) en DMF (0,50 M), se añadió carbonato de potasio (1,2 equiv.) y 4-(bromometil)bencilfosfonato de dietilo (1 equiv.) (descrito en la

referencia 88, Ej. 25, Etapa 1). A continuación se calentó la mezcla de reacción a 60°C durante 5 horas. En este momento, se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH™ (ISCO) utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-5% para proporcionar el compuesto del título (18%) en forma de sólido.

5

Etapa 2: 4-((6-amino-2-(2-metoxietoxi)-9H-purin-9-il)metil)encilfosfonato de dietilo

A una solución de 4-((6-amino-2-cloro-9H-purin-9-il)metil)encilfosfonato de dietilo (1 equiv.) en 2-metoxietanol (0,10 M), se añadió hidruro de sodio (1,3 equiv.). A continuación, se calentó la mezcla de reacción a 120°C durante 18 horas. En este momento, se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. A continuación, se diluyó la mezcla con agua y EtOAc. Se transfirió esta mezcla a un embudo de decantación y se lavó tres veces con agua. A continuación, se separó la capa orgánica, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH™ utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-10% para proporcionar el compuesto del título con rendimiento cuantitativo, en forma de sólido.

15

Etapa 3: 4-((6-amino-8-bromo-2-(2-metoxietoxi)-9H-purin-9-il)metil)encilfosfonato de dietilo

A una solución de 4-((6-amino-2-(2-metoxietoxi)-9H-purin-9-il)metil)encilfosfonato de dietilo (1 equiv.) en ácido acético (0,20 M), se añadió acetato de sodio (15 equiv.) y bromo (13 equiv.). A continuación, se dejó en agitación la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 horas. En este momento, se interrumpió la reacción añadiendo tiosulfato de sodio. A continuación, se diluyó la mezcla con agua y DCM. Se transfirió esta mezcla a un embudo de decantación y se lavó tres veces con DCM. A continuación, se secaron las capas orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH™ utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-5% para proporcionar el compuesto del título (14%) en forma de sólido.

20

25

Etapa 4: 4-((6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)-9H-purin-9-il)metil)encilfosfonato de dietilo

A una solución de 4-((6-amino-8-bromo-2-(2-metoxietoxi)-9H-purin-9-il)metil)encilfosfonato de dietilo en metanol (0,10 M), se añadió metóxido de sodio (20 equiv.). A continuación, se dejó en agitación la mezcla de reacción a 70°C durante 18 horas. En este momento, se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y, a continuación, se inactivó añadiendo cloruro de amonio. A continuación, se diluyó la mezcla con DCM, se transfirió a un embudo de decantación y se lavó tres veces con DCM. A continuación, se secaron las capas orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se eliminaron los volátiles a vacío. El compuesto sólido resultante (38%) se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.

30

35

Etapa 5: ácido 4-((6-amino-2-(2-metoxietoxi)-8-oxo-7H-purin-9(8H)-il)metil)encilfosfónico

A una solución de 4-((6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)-9H-purin-9-il)metil)encilfosfonato de dietilo (1 equiv.) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,10 M) a 0°C, se añadió lentamente bromuro de trimetilsililo (10 equiv.). Al cabo de 1 hora, se retiró el baño de hielo y se dejó en agitación la mezcla de reacción a 22°C durante 2 horas. En este momento, se eliminaron los volátiles a vacío y se purificó el residuo resultante mediante HPLC de fase inversa utilizando un gradiente del 20%-90% de NH<sub>4</sub>OAc 0,5 mM (en MeCN) a NH<sub>4</sub>OAc 10 mM (en agua) para dar el compuesto del título (29%) en forma de sólido. <sup>1</sup>H RMN (dimetilsulfóxido-d<sub>6</sub>): δ 7,16-7,11 (br, 4H), 6,58 (br, 2H), 4,77 (s, 2H), 4,25 (t, 2H, J = 4,0 Hz), 3,58 (t, 2H, J = 4,0 Hz), 3,27 (s, 3H), 2,73 (s, 1H), 2,67 (s, 1H). LRMS [M+H] = 410,1

40

45

Se evalúa la actividad de este compuesto en un ensayo utilizando células HEK293 que están transfectadas establemente con TLR7 humano y un vector indicador de luciferasa activado por NF-κB (pNifty-Luciferasa). Como ensayo de control, se utilizan HEK293 normales transfectadas con pNifty-Luc. Las células se cultivan en DMEM complementado con L-glutamina 2mM, FBS al 10% inactivado con calor, estreptomicina y penicilina al 1%, 2 µg/ml de puomicina y 5 µg/ml de blastidina. El tampón de ensayo de luciferasa Bright-Glo™ y el sustrato son suministrados por Promega. Las células se siembran en placas a 25.000 células/pocillo en placas de 384 pocillos a un volumen final de 50 µl de medio. Se deja que las células se adhieran a las placas después de cultivo durante toda la noche (18 horas) a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. A continuación, se distribuyen a cada pocillo los compuestos de control positivo y experimentales sometidos a dilución en serie y se incuban durante 7 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Las células estimuladas con DMSO solo hacen las veces de controles negativos. Después de la incubación, se añaden a cada pocillo 30 µl de tampón de ensayo de premezcla y tampón sustrato según las instrucciones del fabricante. La señal de luminiscencia se lee en una máquina CLIPR con un tiempo de integración de 20 segundos por placa. Se generan para cada compuesto las curvas de respuesta a la dosis y se determinan los valores de CE<sub>50</sub> como la concentración que da el 50% de la señal máxima. Los valores de CE<sub>50</sub> también se comparan con la actividad de resiquimod (ajustado al 100%).

50

55

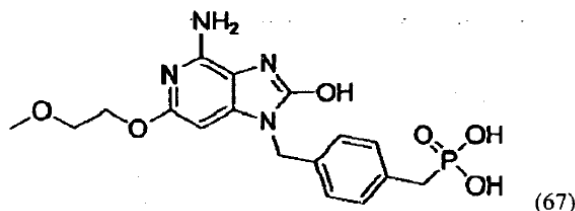
60

El compuesto 6 presenta una CE<sub>50</sub> de 0,41 µM o 93%. En los esplenocitos presenta una CE<sub>50</sub> de 0,98 µM (210%). En las PBMC humanas, presenta una CE<sub>50</sub> de 1,0 (35%). Es soluble en tampón de histidina a pH 6,8.

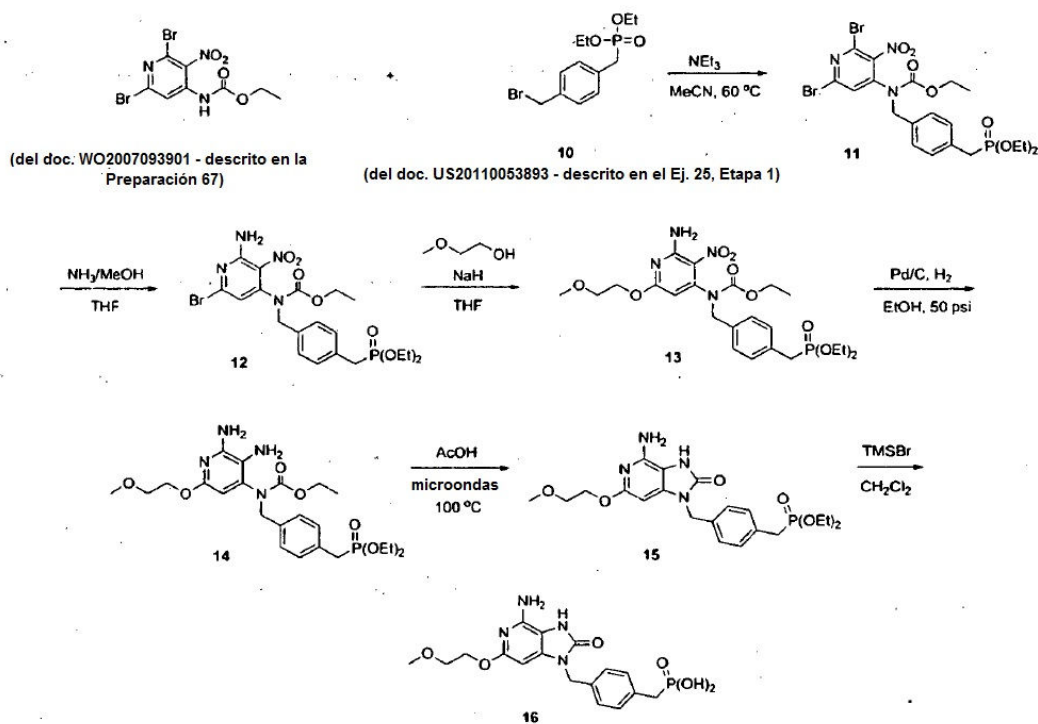
65

**Fórmula (C) - compuestos desazapurínicos**

Se sintetiza el siguiente fosfocompuesto 67 (un análogo desazapurínico del compuesto de adenina 6), en base a los compuestos desazapurínicos precusores descritos en las referencias 18-20:



El compuesto 67 puede sintetizarse según el esquema que se muestra a continuación, los números de referencia se refieren a los compuestos que se muestran en el siguiente esquema, y no en relación a la numeración de compuestos establecida en otra parte de la presente solicitud. El compuesto identificado con el número de referencia 16 en el siguiente esquema es el compuesto 67 de la invención.



Con respecto al esquema anterior, la alquilación de la piridina 9 (descrito en la referencia 18, Preparación 67) con bromuro de bencilo 10 (descrito en la referencia 88, Ej. 25, Etapa 1) da el compuesto intermedio 11. A continuación, la aminación de 11 con amoníaco da la piridina 12. A continuación, se sustituye el bromuro de arilo de 12 con 2-metoxietanol para proporcionar el compuesto intermedio 13. A continuación, la hidrogenación de 13 proporciona la diamina 14. A continuación, el tratamiento de 14 con ácido acético en condiciones de microondas da la deazapurina 15. A continuación, se hidroliza el compuesto intermedio 15 con bromotrimetilsilano para dar el ácido fosfónico 16.

Los detalles experimentales de la síntesis anterior del compuesto 67 son los siguientes.

#### Etapa 1: (2,6-dibromo-3-nitropiridin-4-il)(4-((dietoxifosforil)metil)bencil)carbamato de etilo

A una solución de (2,6-dibromo-3-nitropiridin-4-il)carbamato de etilo (1 equiv.) (descrito en la referencia 18, Preparación 67) en acetonitrilo (0,40 M), se añadió trietilamina (1,5 equiv.) y 4-(bromometil)bencilfosfonato de dietilo (1,3 equiv.) (descrito en la referencia 88, Ej. 25, Etapa 1). A continuación, se calentó la mezcla de reacción a 60°C durante 18 horas. En este momento, se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH™ utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-5% para proporcionar el compuesto del título (38%) en forma de sólido.

Etapa 2: (2-amino-6-bromo-3-nitropiridin-4-il)(4-((dietoxifosforil)metil)bencil)carbamato de etilo

5 A una solución de (2,6-dibromo-3-nitropiridin-4-il)(4-((dietoxifosforil)metil)bencil)carbamato de etilo (1 equiv.) en THF (0,40 M), se añadió una solución 7 M de amoníaco en metanol (5 equiv.). A continuación, se dejó en agitación la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 48 horas. En este momento, se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH™ utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-5% para proporcionar el compuesto del título (68%) en forma de sólido.

10 Etapa 3: (2-amino-6-(2-metoxietoxi)-3-nitropiridin-4-il)(4-((dietoxifosforil)metil)bencil)carbamato de etilo

15 A una solución de (2-amino-6-bromo-3-nitropiridin-4-il)(4-((dietoxifosforil)metil)bencil)carbamato de etilo (1 equiv.) en THF (0,30 M), se añadió hidruro de sodio (5 equiv.) en una solución de 2-metoxietanol (0,50 M). Se dejó en agitación la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. En este momento, se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH™ utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-5% para proporcionar el compuesto del título (68%) en forma de sólido.

Etapa 4: (2,3-diamino-6-(2-metoxietoxi)piridin-4-il)(4-((dietoxifosforil)metil)bencil)carbamato de etilo

20 A una solución de (2-amino-6-(2-metoxietoxi)-3-nitropiridin-4-il)(4-((dietoxifosforil)metil)bencil)carbamato de etilo (1 equiv.) en EtOH (0,05 M), se añadió Pd/C al 10% (50% equiv. en peso) en un matraz agitador Paar. Se colocó la mezcla de reacción en un agitador Paar a 55 psi durante 4 horas. En este momento, se hizo pasar la mezcla de reacción a través de un lecho de Celite, lavando con una mezcla 2:1 de CHCl<sub>3</sub>:MeOH. Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se eliminaron los volátiles a vacío. El residuo resultante se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Etapa 5: 4-((4-amino-6-(2-metoxietoxi)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il)metil)bencilfosfonato de dietilo

30 A una solución de (2,3-diamino-6-(2-metoxietoxi)piridin-4-il)(4-((dietoxifosforil)metil)bencil)carbamato de etilo (1 equiv.) en AcOH (0,15 M) se calentó en un microondas a 100°C durante 5 minutos. En este momento, se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH™ utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-10% para proporcionar el compuesto del título (63% a lo largo de dos etapas) en forma de sólido.

35

Etapa 6: ácido (4-((4-amino-6-(2-metoxietoxi)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il)metil)bencil)fosfónico

40 A una solución de 4-((4-amino-6-(2-metoxietoxi)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il)metil)bencilfosfonato de dietilo (1 equiv.) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,10 M) a 0°C, se añadió lentamente bromuro de trimetilsililo (10 equiv.). Al cabo de 1 hora, se retiró el baño de hielo y se dejó en agitación la mezcla de reacción a 22°C durante 18 horas. En este momento, se eliminaron los volátiles a vacío y se purificó el residuo resultante mediante HPLC de fase inversa utilizando un gradiente del 20%-90% de NH<sub>4</sub>OAc 0,5 mM (en MeCN) a NH<sub>4</sub>OAc 10 mM (en agua) para dar el compuesto del título (41%) en forma de sólido.

45 <sup>1</sup>H RMN (dimetilsulfóxido-d<sub>6</sub>): δ 7,09-7,05 (br, 4H), 5,79 (s, 1H), 5,63 (br, 2H), 4,78 (s, 2H), 4,17 (t, 2H, J = 4,8 Hz), 3,55 (t, 2H, J = 4,8 Hz), 3,23 (s, 3H), 2,71 (s, 1H), 2,66 (s, 1H). LRMS [M+H] = 409,1

El compuesto 67 presenta una CE<sub>50</sub> de 6,5 μM ó 103% en las células HEK293. En los esplenocitos, presenta una CE<sub>50</sub> de 9,3 μM (142%). En las PBMC humanas, presenta una CE<sub>50</sub> de 0,8 (59%). Es soluble en tampón de histidina a pH 6,8.

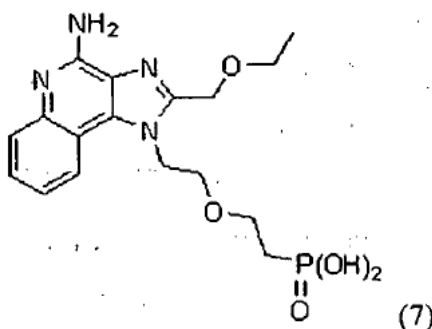
50 **Fórmula (D)**

Se sintetiza el siguiente fosfocompuesto, en base a los compuestos de imidazoquinolina sustituidos precursores descritos en las referencias 2 y 22:

55

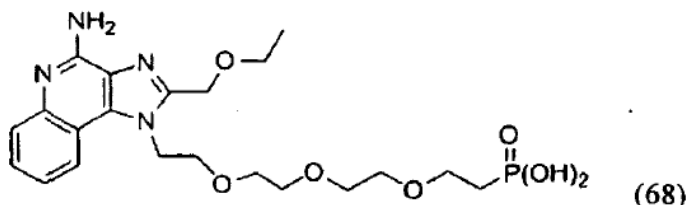
60

65

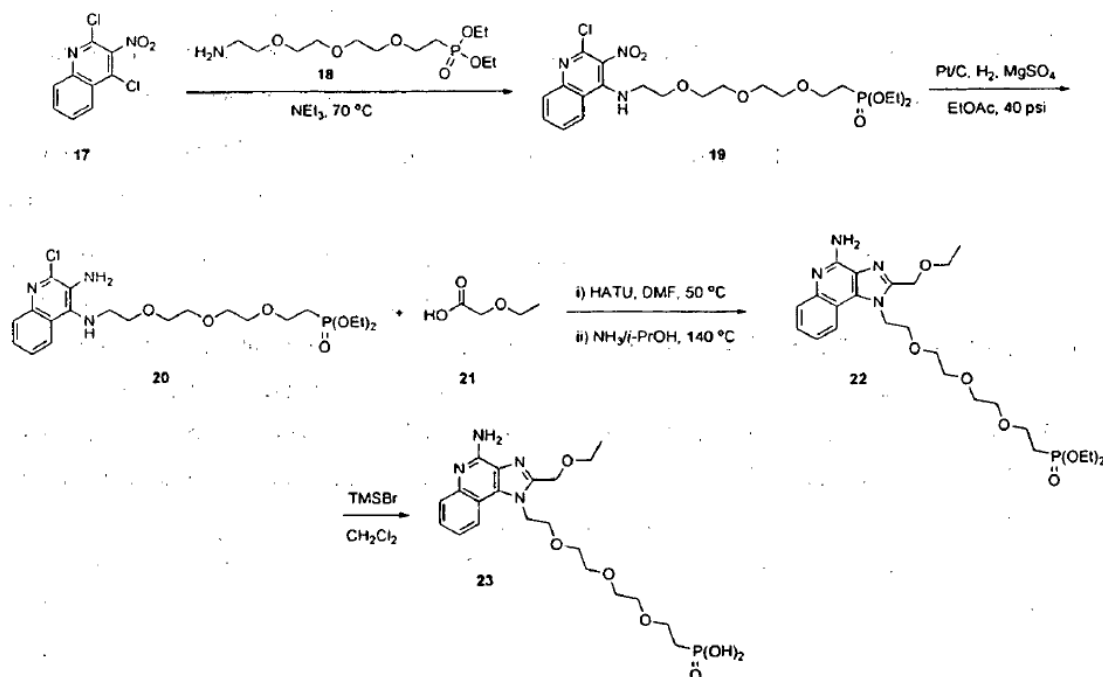


El compuesto 7 tiene una  $CE_{50}$  de 66  $\mu$ M (55%) en el ensayo de HEK293 descrito anteriormente, pero es inactivo en los esplenocitos y en las PBMC humanas. Es insoluble en tampón de histidina a pH 6,8.

También se preparan formas modificadas del compuesto 7, con largos conectores de etilenglicol, (compuestos 37 y 68). El compuesto 68 tiene una  $CE_{50}$  de 28  $\mu$ M (75%) en las células HEK293 pero, de nuevo, es inactivo en los esplenocitos y en las PBMC humanas. A diferencia del compuesto (7), es soluble en tampón de histidina a pH 6,8.



El compuesto 68 puede sintetizarse según el esquema que se muestra a continuación, los números de referencia se refieren a los compuestos que se muestran en el siguiente esquema, y no en relación a la numeración de compuestos establecida en otra parte de la presente solicitud. El compuesto identificado con el número de referencia 23 en el siguiente esquema es el compuesto 68 de la invención.



Con respecto al esquema anterior, se sustituye una quinolina 17, disponible en el mercado, con una amina 18 para proporcionar el compuesto intermedio 19. A continuación, la reducción del grupo nitro en 19 proporciona el compuesto intermedio 20. A continuación, el acoplamiento del compuesto intermedio 20 con ácido 2-etoxiacético proporciona el compuesto intermedio 21. A continuación, la aminación del compuesto intermedio 21 con amoníaco proporciona la imidazoquinolina 22. A continuación, la hidrólisis de 22 con bromotrimetilsilano proporciona el ácido fosfónico 23.

Los detalles experimentales de la síntesis anterior del compuesto 68 son los siguientes.

Etapas 1: (2-(2-(2-(2-((2-cloro-3-nitroquinolin-4-il)amino)etoxi)etoxi)etoxi)etil)fosfonato de dietilo

A una solución de 2,4-dicloro-3-nitroquinolina (1 equiv.), disponible en el mercado, en trietilamina (0,30 M), se añadió (2-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)etil)fosfonato de dietilo (1,3 equiv.) disponible en el mercado (proporcionado por PHARMARON). Se agitó la mezcla de reacción resultante a 70 °C durante 2 horas. En este momento, se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH™ utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-5% para proporcionar el compuesto del título (63%) en forma de sólido.



Etapa 2: (2-(2-(2-(2-((3-amino-2-cloroquinolin-4-il)amino)etoxi)etoxi)etoxi)etil)fosfonato de dietilo

A una solución de (2-(2-(2-(2-((3-amino-2-cloroquinolin-4-il)amino)etoxi)etoxi)etoxi)etil)fosfonato de dietilo (1 equiv.) en EtOAc (0,10 M), se añadió Pt/C al 10% (5% equiv. en peso) y MgSO<sub>4</sub> (2 equiv.) en un matraz agitador Paar. Se colocó la mezcla de reacción en un agitador Paar a 40 psi durante 7 horas. En este momento, se hizo pasar la mezcla de reacción a través de un lecho de Celite, lavando con una mezcla 2:1 de CHCl<sub>3</sub>:MeOH. Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH™ utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-10% para proporcionar el compuesto del título (97%) en forma de sólido.

Etapa 3: (2-(2-(2-(2-(4-amino-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)fosfosfonato de dietilo

A una solución de (2-(2-(2-(2-((3-amino-2-cloroquinolin-4-il)amino)etoxi)etoxi)etoxi)etil)fosfonato de dietilo (1 equiv.) en DMF (0,25 M), se añadió hexafluorofosfato de (2-(7-Aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (1 equiv.) y ácido 2-etoxiacético 21 (1,2 equiv.). Se calentó la mezcla de reacción resultante a 50°C durante 18 horas. En este momento, se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. A continuación, se diluyó la mezcla con agua y EtOAc. Se transfirió esta mezcla a un embudo de decantación y se lavó tres veces con agua. A continuación, se separó la capa orgánica, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH™ utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-10% para proporcionar el compuesto intermedio acoplado (19%) en forma de sólido. A continuación, se calentó a 100°C una solución de este compuesto intermedio (1 equiv.) en amoniaco 2 M en isopropanol (0,06 M) durante tres días. En este momento, se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-10% para proporcionar el compuesto del título (62%) en forma de sólido.

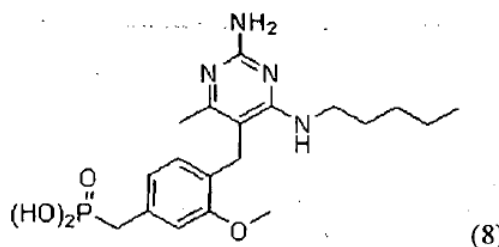
Etapa 4: ácido (2-(2-(2-(2-(4-amino-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)fosfónico

A una solución de (2-(2-(2-(2-(4-amino-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)fosfonato de dietilo (1 equiv.) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,10 M) a 0°C, se añadió lentamente bromuro de trimetilsililo (10 equiv.). Al cabo de 1 hora, se retiró el baño de hielo y se dejó en agitación la mezcla de reacción a 22°C durante 18 horas. En este momento, se eliminaron los volátiles a vacío y se purificó el residuo resultante mediante HPLC de fase inversa utilizando un gradiente del 20%-90% de NH<sub>4</sub>OAc 0,5 mM (en MeCN) a NH<sub>4</sub>OAc 10 mM (en agua) para dar el compuesto del título (26%) en forma de sólido.

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>): δ 8,00-7,76 (m, 2H), 7,51-7,28 (m, 2H), 4,91-4,72 (m, 4H), 3,98-3,84 (m, 2H), 3,72-3,54 (m, 4H), 3,48-3,38 (m, 2H), 3,30-3,29 (m, 2H), 3,13-3,00 (m, 2H), 2,10-1,96 (m, 2H), 1,31-1,11 (m, 3H). LRMS [M+H] = 483,1.

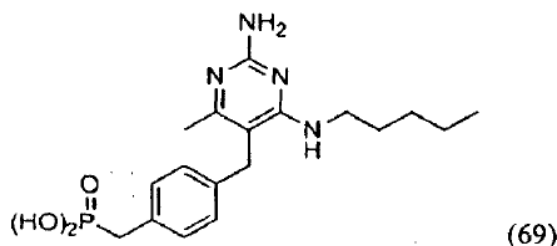
**Fórmula (E)**

Se sintetiza el siguiente fosfocompuesto, en base a los compuestos pirimidínicos precursores descritos en la referencia 5, por ejemplo, el éster del Ejemplo 21:



El compuesto 8 tiene una CE<sub>50</sub> de 7,3 μM (81%) en el ensayo de HEK293 descrito anteriormente. En los esplenocitos, presenta una CE<sub>50</sub> de 3,1 μM (184%). En las PBMC humanas presenta una CE<sub>50</sub> de 10,4 (50%). Es insoluble en tampón de histidina a pH 6,8.

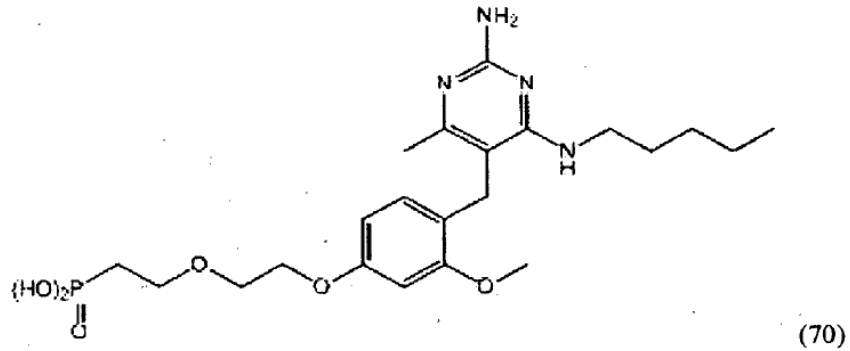
Se preparan compuestos adicionales de fórmula (E):



5

10

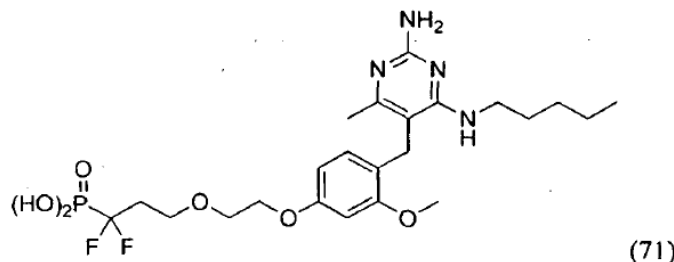
15



(70)

20

25



(71)

30

El compuesto (69) presenta una  $\text{CE}_{50}$  de  $47,4 \mu\text{M}$  (36%) en las células HEK293, pero es inactivo en los esplenocitos y en las PBMC humanas. Es insoluble en tampón de histidina a pH 6,8. El compuesto 70 también tenía poca solubilidad.

35

El compuesto 71 presenta una  $\text{CE}_{50}$  de  $2,7 \mu\text{M}$  (53%) en las HEK293. En los esplenocitos, presenta una  $\text{CE}_{50}$  de  $10,5 \mu\text{M}$  (239%). En las PBMC humanas, presenta una  $\text{CE}_{50}$  de  $9,5$  (50%). Es soluble en tampón de histidina a pH 6,8.

40

El compuesto 71 puede sintetizarse según el esquema que se muestra a continuación, los números de referencia se refieren a los compuestos que se muestran en el siguiente esquema, y no en relación a la numeración de compuestos establecida en otra parte de la presente solicitud. El compuesto identificado con el número de referencia 8 en el siguiente esquema es el compuesto 71 de la invención.

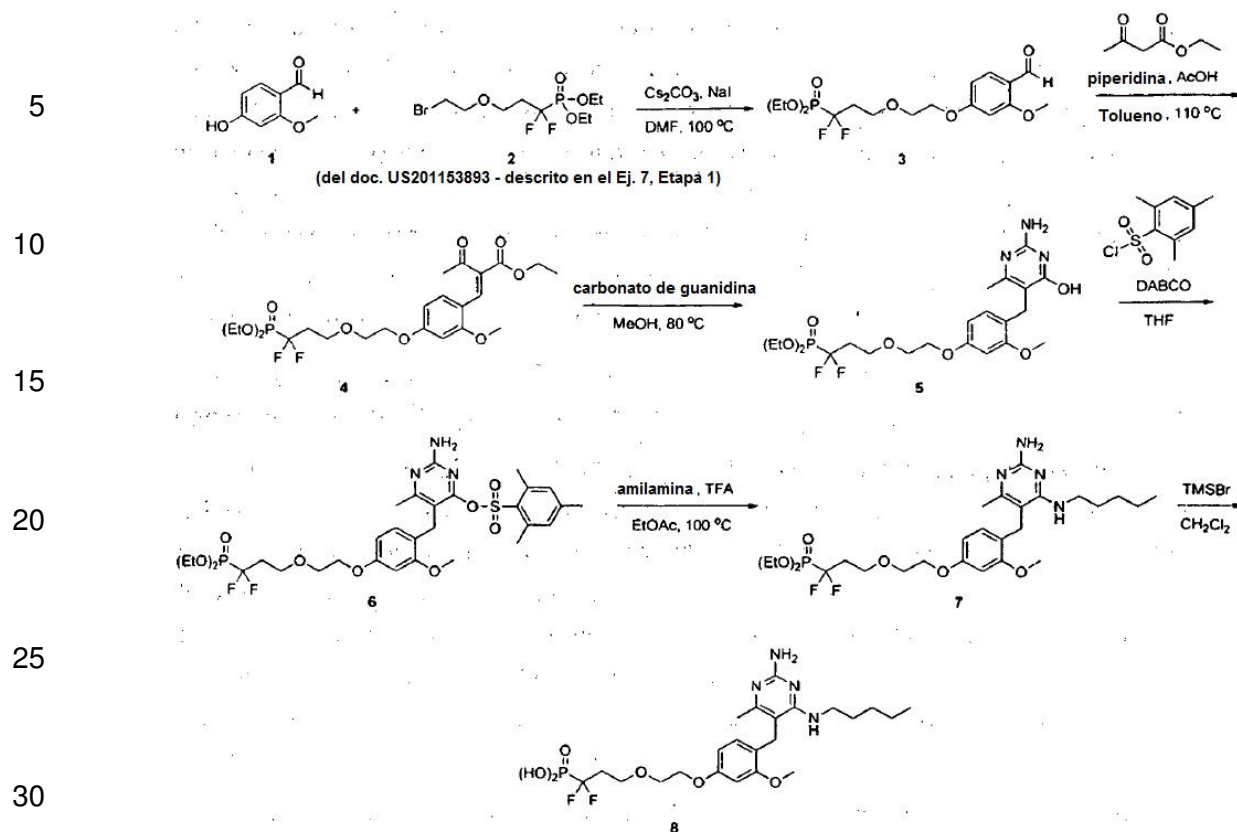
45

50

55

60

65



Con respecto al esquema anterior, se alquila el fenol 1, disponible en el mercado, con el bromuro de 2 (descrito en la referencia 88, Ej. 7, Etapa 1) para dar el compuesto intermedio 3. A continuación, la condensación del compuesto intermedio 3 con acetoacetato de etilo proporciona el enoato 4. A continuación, la ciclación de 4 con carbonato de guanidina proporciona la pirimidina 5. A continuación, se convierte el compuesto intermedio 5 en la sulfona 6 que se sustituye con amilamina para dar la pirimidina 7. A continuación, la hidrólisis de 7 con bromotrimetilsilano proporciona el ácido fosfónico 8.

40 Etapa 1: (1,1-difluoro-3-(2-(4-formil-3-metoxifenoxi)etoxi)propil)fosfonato de dietilo

A una solución de 4-hidroxi-2-metoxibenzaldehído (1 equiv.) en DMF (0,25 M), se añadió carbonato de cesio (2 equiv.), yoduro de sodio (0,20 equiv.) y (3-(2-bromoetoxi)-1,1-difluoropropil)fosfonato de dietilo (1,2 equiv.) (descrito en la referencia 88, Ej. 7, Etapa 1). Se agitó la mezcla de reacción a 100 °C durante 3 horas, después de lo cual se dejó enfriar a temperatura ambiente. A continuación, se diluyó la mezcla resultante con agua y EtOAc. Se transfirió esta mezcla a un embudo de decantación y se lavó tres veces con agua. A continuación, se separó la capa orgánica, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH™ utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-5% para proporcionar el compuesto del título (79%) en forma de sólido.

50 Etapa 2: 2-(4-(2-(3-(dietoxifosforil)-3,3-difluoropropoxi)etoxi)-2-metoxibencilideno)-3-oxobutanoato de (E)-etilo

A una solución de (1,1-difluoro-3-(2-(4-formil-3-metoxifenoxi)etoxi)propil)fosfonato de dietilo (1 equiv.) en tolueno (0,50 M), se añadió piperidina (0,10 equiv.), ácido acético (0,50 equiv.) y acetoacetato de etilo (1,2 equiv.). A continuación, se calentó la mezcla de reacción a 110 °C durante 18 horas. En este momento, se añadieron a la mezcla de reacción piperidina (0,10 equiv.), ácido acético (0,50 equiv.) y acetoacetato de etilo (0,50 equiv.) adicionales, y se siguió calentando a 110 °C durante 4 horas. En este momento, se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH™ utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-5% para proporcionar el compuesto del título (78%) en forma de sólido.

60 Etapa 3: (3-(2-(4-((2-amino-4-hidroxi-6-metilpirimidin-5-il)metil)-3-metoxifenoxi)etoxi)-1,1-difluoropropil)fosfonato de dietilo

A una solución de 2-(4-(2-(3-(dietoxifosforil)-3,3-difluoropropoxi)etoxi)-2-metoxibencilideno)-3-oxobutanoato de (E)-etilo (1 equiv.) en MeOH (0,20 M), se añadió carbonato de guanidina (1,1 equiv.) y se calentó la mezcla de

reacción a 80 °C durante 3 horas. En este momento, se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y a continuación se diluyó con agua y EtOAc. Se transfirió la mezcla resultante a un embudo de decantación y se lavó tres veces con EtOAc. Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH™ utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-10% para proporcionar el compuesto del título (15%) en forma de sólido.

Etapa 4: 2,4,6-trimetilbencenosulfonato de 2-amino-5-(4-(2-(3-(dietoxifosforil)-3,3-difluoropropoxi)etoxi)-2-metoxibencil)-6-metilpirimidin-4-ilo

A una solución de (3-(2-(4-((2-amino-4-hidroxi-6-metilpirimidin-5-il)metil)-3-metoxifenoxi)etoxi)-1,1-difluoropropil)fosfonato de dietilo (1 equiv.) en THF (0,40 M), se añadió 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (1,8 equiv.) y cloruro de 2,4,6-trimetilbenceno-1-sulfonilo (1,3 equiv.). Se dejó en agitación la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 horas, después de lo cual se inactivó con HCl acuoso (0,10 N). Se transfirió la mezcla resultante a un embudo de decantación y se lavó tres veces con cloroformo. Se secaron las capas orgánicas combinadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH™ utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-5% para proporcionar el compuesto del título (41%) en forma de sólido.

Etapa 5: (3-(2-(4-((2-amino-4-metil-6-(pentilamino)pirimidin-5-il)metil)-3-metoxifenoxi)etoxi)-1,1-difluoropropil)fosfonato de dietilo

A una solución de 2,4,6-trimetilbencenosulfonato de 2-amino-5-(4-(2-(3-(dietoxifosforil)-3,3-difluoropropoxi)etoxi)-2-metoxibencil)-6-metilpirimidin-4-ilo (1 equiv.) en EtOAc (0,20 M), se añadieron TFA (1,1 equiv.) y amilamina (3,3 equiv.). A continuación, se calentó la mezcla de reacción a 100 °C durante 18 horas. En este momento, se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se eliminaron los volátiles a vacío. Se purificó el residuo resultante mediante un sistema COMBIFLASH™ utilizando un gradiente de MeOH/DCM al 0%-10% para proporcionar el compuesto del título (76%) en forma de sólido.

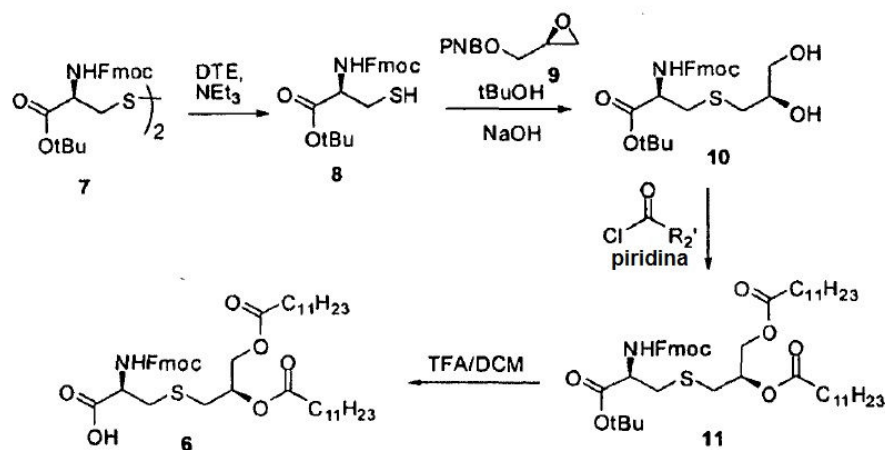
Etapa 6: ácido (3-(2-(4-((2-amino-4-metil-6-(pentilamino)pirimidin-5-il)metil)-3-metoxifenoxi)etoxi)-1,1-difluoropropil)fosfónico

A una solución de (3-(2-(4-((2-amino-4-metil-6-(pentilamino)pirimidin-5-il)metil)-3-metoxifenoxi)etoxi)-1,1-difluoropropil)fosfonato de dietilo (1 equiv.) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,10 M) a 0 °C, se añadió lentamente bromuro de trimetilsililo (10 equiv.). Al cabo de 1 hora, se retiró el baño de hielo y se dejó en agitación la mezcla de reacción a 22 °C durante 18 horas. En este momento, se eliminaron los volátiles a vacío y se purificó el residuo resultante mediante HPLC de fase inversa utilizando un gradiente del 20%-90% de NH<sub>4</sub>OAc 0,5 mM (en MeCN) a NH<sub>4</sub>OAc 10 mM (en agua) para dar el compuesto del título (70%) en forma de sólido.

<sup>1</sup>H RMN (Metanol-d<sub>4</sub>): δ 6,81 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 6,62 (s, 1H), 6,48 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 4,09 (t, 2H, J = 4,4 Hz), 3,90 (s, 3H), 3,86 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 3,79 (t, 2H, J = 4,4 Hz), 3,67 (s, 2H), 3,43 (t, 2H, J = 7,2 Hz), 2,30 (s, 3H), 2,22 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 2,06-2,01 (m, 2H), 1,33-1,10 (m, 4H), 0,88 (t, 3H, J = 7,6 Hz). LRMS [M+H] = 533,3.

### Fórmula (III) (Ejemplo de referencia)

El compuesto de partida para preparar el compuesto 19 fue ácido (5R,9R)-9-(dodecanoiloxi)-1-(9H-fluoren-9-il)-3,12-dioxo-2,11-dioxa-7-tia-4-azatricosano-5-carboxílico ("TLR2-pre"), preparado de la siguiente manera:



Etapa 1: 2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-mercaptopropanoato de (R)-terc-butilo (8)

Se agitó a temperatura ambiente una solución de (*N*-Fmoc-Cys-OtBu)<sub>2</sub> (7, 1 eq.), NEt<sub>3</sub> (3 eq.) y DTE (1,4-Ditioeritritol, 2,5 eq.) en DCM (0,1 M), hasta su total reducción (1,5 horas). Se diluyó la mezcla de reacción en DCM, se lavó tres veces con ácido cítrico al 5%, dos veces con agua y una vez con salmuera. Se secó la capa orgánica sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró a vacío. Se purificó el producto bruto resultante mediante cromatografía ultrarrápida en un sistema COMBIFLASH® (ISCO) utilizando EtOAc/Hex al 0%-30% para dar el producto del título en forma de aceite viscoso incoloro.

Etapa 2: 2-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-((*R*)-2,3-dihidroxiopropiltio)propanoato de (*R*)-terc-butilo (10)

Se agitó a temperatura ambiente una solución de (2*S*)-(+)-glicidil-4-nitrobenzoato (9, 1,1 eq.) y NaOH 1 M (1,1 eq.) en *t*-BuOH (0,1 M) hasta la total hidrólisis del nitrobenzoato (30 minutos). Se introdujo en la mezcla resultante una solución de 2-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-mercaptopropanoato de (*R*)-terc-butilo (8,1 eq.) en *t*-BuOH (1 M). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 15 horas. Se concentró la mezcla de reacción a vacío para eliminar el *t*-BuOH y se disolvió en EtOAc. Se lavó tres veces la solución de EtOAc con agua y una vez con salmuera. Se purificó el producto bruto resultante mediante cromatografía ultrarrápida en un sistema COMBIFLASH® (ISCO) utilizando EtOAc/Hex al 0%-90% para dar el producto del título en forma de aceite viscoso incoloro.

Etapa 3: didodecanoato de (*R*)-3-((*R*)-2-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-terc-butoxi-3-oxopropiltio)propano-1,2-diilo (11)

Se enfrió en un baño de hielo una solución de 2-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-((*R*)-2,3-dihidroxiopropiltio)propanoato de (*R*)-terc-butilo (10, 1 eq.) en DCM (0,1 M). Se añadió piridina (3,7 eq.) seguido de cloruro de dodecanoilo (3,7 eq.). Se agitó la mezcla de reacción durante 10 minutos, a continuación se calentó hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. Se diluyó la mezcla de reacción con DCM, se lavó con NH<sub>4</sub>Cl acuoso saturado. La fase acuosa volvió a extraerse con DCM. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con H<sub>2</sub>O, y la fase acuosa volvió a extraerse con DCM. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron a vacío. Se purificó el producto bruto resultante mediante cromatografía ultrarrápida en un sistema COMBIFLASH® (ISCO) utilizando EtOAc/Hex al 0%-30% para dar el producto del título en forma de sólido blanco.

Etapa 4: ácido (5*R*,9*R*)-9-(dodecanoiloxi)-1-(9*H*-fluoren-9-il)-3,12-dioxo-2,11-dioxa-7-tia-4-azatricosano-5-carboxílico ("TLR2-pre")

Se agitó a temperatura ambiente una solución de didodecanoato de (*R*)-3-((*R*)-2-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-terc-butoxi-3-oxopropiltio)propano-1,2-diilo (11) en TFA en DCM al 40% (0,3 M) hasta la total desprotección de grupo *terc*-butilo (2 horas). Se diluyó la mezcla de reacción en MTBE, se lavó tres veces con ácido cítrico 1 M (ajustado a pH 3) y una vez con HCl 1 N/salmuera 1:2. Se secó la capa orgánica sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró a vacío. El sólido céreo resultante se utilizó sin purificación adicional.

Este material se utilizó para preparar los compuestos 17, 19 y 22. Por ejemplo, el compuesto 19 se preparó de la siguiente manera:

Etapa 1: 2-(2-(2-yodoetoxi)etoxi)etilfosfonato de dietilo

Se mezcló 1,2-bis(2-yodoetoxi)etano (1,0 eq.) con fosfato de trietilo (1 eq.), a continuación se calentó a 160 °C durante 20 minutos en microondas. Se purificó la mezcla bruta mediante cromatografía ultrarrápida en un sistema COMBIFLASH™ utilizando EtOAc/Hex al 85%-100% para dar 2-(2-(2-yodoetoxi)etoxi)etilfosfonato de dietilo en forma de aceite incoloro.

Etapa 2: 2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etilfosfonato de dietilo

A una solución de 2-(2-(2-yodoetoxi)etoxi)etilfosfonato de dietilo (1 eq.) en EtOH (0,2 M), se añadió azida de sodio (5 eq.) en agua (1,4 M). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante toda la noche. A continuación, se diluyó la mezcla con agua, se extrajo con EtOAc (3 veces). Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentraron a vacío. Se purificó el material bruto mediante cromatografía ultrarrápida en un sistema COMBIFLASH™ utilizando MeOH/DCM al 0%-5% para dar 2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etilfosfonato de dietilo en forma de aceite incoloro.

Etapa 3: 2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etilfosfonato de dietilo

Se disolvió 2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etilfosfonato de dietilo (1 eq.) en EtOH (0,1 M). Se añadió a la reacción Pd (OH)<sub>2</sub> (0,05 eq.). Se introdujo hidrógeno gaseoso por medio de un globo y se agitó la reacción durante 2 horas a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla a través de Celite y se lavó con MeOH. Se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el material bruto mediante cromatografía ultrarrápida en un sistema COMBIFLASH™ utilizando MeOH/DCM al 0%-10% con NH<sub>3</sub> al 0,5% para dar 2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etilfosfonato de dietilo en forma de aceite

incoloro.

Etapa 4: (11R,15R)-11-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-15-(dodecanoiloxi)-10,18-dioxo-3,6,17-trioxa-13-tia-9-azanonacosilfosforil dietil éster

A una solución de TLR2-pre (1 eq.) en DCM (0,1 M), se añadió 2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etilfosfonato de dietilo (1,3 eq.), DIEA (2,5 eq.) y HBTU (1,2 eq.). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se purificó la mezcla bruta mediante cromatografía ultrarrápida en un sistema COMBIFLASH™ utilizando EtOAc/Hex al 70%-100% para dar (11R,15R)-11-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-15-(dodecanoiloxi)-10,18-dioxo-3,6,17-trioxa-13-tia-9-azanonacosilfosforil dietil éster.

Etapa 5: (11R,15R)-11-amino-15-(dodecanoiloxi)-10,18-dioxo-3,6,17-trioxa-13-tia-9-azanonacosil fosforil dietil éster

A una solución de (11R,15R)-11-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-15-(dodecanoiloxi)-10,18-dioxo-3,6,17-trioxa-13-tia-9-azanonacosilfosforil dietil éster (1 eq.), se añadió piperidina al 20% (50 eq.) en acetonitrilo. Se diluyó la mezcla resultante con DCM y se expuso a ultrasonidos durante 3 minutos. Se añadió tolueno a la mezcla y a continuación se concentró a vacío. Se purificó la mezcla bruta mediante cromatografía ultrarrápida en un sistema COMBIFLASH™ utilizando EA al 100% seguido de MeOH en DCM al 0%-10% para dar (11R,15R)-11-amino-15-(dodecanoiloxi)-10,18-dioxo-3,6,17-trioxa-13-tia-9-azanonacosil fosforil dietil éster.

Etapa 6: ácido (11R,15R)-11-amino-15-(dodecanoiloxi)-10,18-dioxo-3,6,17-trioxa-13-tia-9-azanonacosil fosfónico.

A una solución de (11R,15R)-11-amino-15-(dodecanoiloxi)-10,18-dioxo-3,6,17-trioxa-13-tia-9-azanonacosil fosforil dietil éster (1 eq.) en DCM (0,1 M), se añadió bromuro de trimetilsililo (10 eq.). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante toda la noche y se concentró. Se purificó la mezcla bruta mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) de fase inversa con una columna C4 eluyendo con un gradiente del 40%-100% de MeCN/NH<sub>4</sub>OAc 10 mM (95:5) en NH<sub>4</sub>OAc 10 mM (pH 9) para dar ácido (11R,15R)-11-amino-15-(dodecanoiloxi)-10,18-dioxo-3,6,17-trioxa-13-tia-9-azanonacosil fosfónico en forma de sólido blanco.

Se ensayaron los compuestos 17, 19 y 22 para determinar la unión a Al-H en tampón de histidina 100 mM a pH 6,5. La unión a Al-H fue > 80% en los tres casos. Otros compuestos que son útiles para la adsorción a Al-H son los compuestos "TLR2p" mencionados anteriormente. La interacción de cuatro de estos compuestos (63-66) con Al-H se ensayó de la misma manera que para los compuestos 17, 19 y 22; la unión fue de nuevo > 80% en todos los casos.

*Impacto de la adsorción sobre el comportamiento de los inmunopotenciadores*

Captación celular

Se aprovechó la autofluorescencia del compuesto 1 para seguir su captación por los PBMC humanos después de la adsorción al Al-H. Se utiliza FACS para monitorizar la captación.

Se incubaron con las células diversas concentraciones de compuesto 1 durante toda la noche a 37°C con o sin Al-H. La presencia de Al-H, al que se adsorbe el compuesto 1, produjo un gran cambio en el patrón de FACS, detectándose específicamente en los monocitos una respuesta a la dosis y un aumento de la fluorescencia. Por lo tanto, las partículas de Al-H pueden potenciar la captación celular del compuesto 1 adsorbido en comparación con el compuesto libre en solución. Por otra parte, los resultados demuestran que el compuesto adsorbido es retenido durante más tiempo en las células después de la entrada.

Se ha observado la misma captación también en otros tipos de células.

El pretratamiento de las células con citocalasina D dio como resultado una menor intensidad de fluorescencia asociada con el compuesto 2, en comparación con las células no tratadas, lo que indica que el proceso de interacción e internalización del compuesto adsorbido está mediado activamente por los monocitos.

La adición de azul de tripano es capaz de "inactivar" la fluorescencia del compuesto 2, pero el azul de tripano no es capaz de penetrar en las células vivas. Las células que no fueron pretratadas con citocalasina D siguieron siendo muy fluorescentes después del tratamiento con azul de tripano, lo que significa que el compuesto 2 se encuentra en el interior de las células. La captación celular era dependiente del tiempo.

Se estudiaron los marcadores de activación de monocitos CD40 y CD80 en respuesta a los compuestos 1, 2 y 5, solos o adsorbidos a Al-H, o a LPS (control positivo). Se ensayaron los compuestos adsorbidos a 5 concentraciones diferentes, a una dosis fija de Al<sup>+++</sup> o con dilución simple. La figura 20 muestra la activación de CD40 y la figura 21 muestra la activación de CD80 utilizando el compuesto 2, ambos marcadores indican una mayor activación en presencia de SMIP adsorbido que con SMIP soluble. Se observó la misma tendencia con los compuestos 1 y 5.

Se comparó el perfil de activación de citocinas del compuesto 2 en forma soluble y adsorbida. No hubo diferencia observable significativa en las respuestas de IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$ .

5 Por lo tanto, la adsorción del compuesto 2 al Al-H da como resultado una captación potenciada del SMIP en la célula y en un mayor grado de activación celular al compararse con la incubación con el SMIP no adsorbido. La captación celular de SMIP está mediada por un proceso activo de internalización que es dependiente del tiempo y de la dosis.

10 Exposición sistémica después de la administración in vivo

15 Se administran los compuestos 1, 2, 3 y 5 a ratones Balb/C por inyección intramuscular a 100  $\mu$ g (4 mg/kg), ya sea con tampón solo o después de la adsorción a un adyuvante de Al-H. Se sigue durante 24 horas la exposición sérica sistémica de los compuestos. Como se muestra en las figuras 1 a 4, mientras que los compuestos no adsorbidos tienen una concentración sérica inicial alta que disminuye rápidamente, los compuestos adsorbidos presentan una respuesta mucho más plana que se mantiene durante un período más largo. Se observaron perfiles similares de exposición sérica sistémica en ratas.

20 A pesar del mayor período de exposición, para estos compuestos la exposición sistémica global puede reducirse mediante adsorción, tal como se mide por separado mediante el AUC para los compuestos 2 y 5:

	2	5
<b>Compuesto</b>	8846	9834
<b>+ Al-H</b>	4553	13908

25 De manera similar a las figuras 1-4, la figura 23 muestra la exposición sérica de los compuestos (A) 6 (B) 67 (C) 68 y (D) 71 durante 24 horas después de la inyección. Las AUC fueron las siguientes (nM hora), y para estos cuatro compuestos fueron en todos los casos mayores cuando estaban adsorbidos:

	6	67	68	71
<b>Compuesto</b>	7176	3573	1391	2093
<b>+ Al-H</b>	13424	8110	2759	4219

35 La figura 16 muestra datos similares para un agonista de TLR2 (compuesto 74). Las AUC de este compuesto y del compuesto 80, ambos agonistas de TLR2 de interés, se redujeron por la adsorción a Al-H:

	74	80
<b>Compuesto</b>	37425	20749
<b>+ Al-H</b>	3389	7264

40 Los valores de Cmax (nM) fueron los siguientes, mostrando en general una reducción cuando están adsorbidos:

	TLR7						TLR2	
	2	5	6	67	68	71	74	80
<b>Compuesto</b>	5600	9273	6124	4057	2122	2603	1937	2823
<b>+ Al-H</b>	465	3319	5521	4514	1721	1807	317	180

55 Se miden las citocinas séricas 24 horas después de la inmunización con el compuesto 1, con o sin Al-H, o con tampón solo. Los niveles de IL-6 y mKC son aproximadamente 4 veces mayores después de la administración del compuesto 1 sin Al-H, y los niveles de MCP-1 son aproximadamente 20 veces mayores (en comparación con el vehículo solo). Por el contrario, cuando se administra en combinación con Al-H, los niveles aumentan en menor grado, siendo < 2 veces mayores (véase la figura 10; véase también la figura 11 para los resultados con el compuesto 2). Para los compuestos 67, 68 y 71 las citocinas sistémicas se redujeron o no se vieron afectadas, en general, por la adsorción a Al-H, mientras que para el compuesto 6 aumentaron los niveles de varias citocinas (por ejemplo, IFN- $\gamma$ , IL1- $\beta$ , IL12-p40).

60 La adsorción del compuesto 1 a Al-H disminuye tanto la proporción de linfocitos T CD4+ que también son CD69+ y la proporción de linfocitos B CD19+ que también son CD86+, y este efecto se observa en el bazo y en los módulos linfáticos de drenaje. Por ejemplo, la adsorción reduce la proporción de linfocitos B CD86+ de

aproximadamente un 75% a aproximadamente un 15%. Se observa una reducción similar en la activación de los linfocitos B cuando los compuestos 6, 67 y 68 se adsorben a Al-H (figura 25, por ejemplo, comparar el grupo F con el grupo C). Por lo tanto, para todos los agonistas de TLR7 ensayados, la adsorción a Al-H reduce la activación general de los linfocitos B.

5 Los niveles musculares de los compuestos 1, 2, 3, 4, 5 y 13 se miden 24 horas después de la inyección intramuscular (100 µg) en ratones Balb/C (3 por grupo) en combinación con antígenos proteicos, con o sin Al-H. Excepto para el compuesto 13, los fosfocompuestos son indetectables si se inyectan sin Al-H, pero se detectan fácilmente si se inyectan con Al-H (véase la figura 5). El compuesto 13 es poco soluble en tampón de histidina, pH 6,8, lo que explica su diferente comportamiento. Los compuestos "precursores" solubles, sin modificaciones para favorecer la adsorción, también se eliminan rápidamente del músculo.

10 En la figura 24 se muestran los resultados de experimentos similares con los compuestos 67, 68 y 71, de nuevo, los compuestos son indetectables 24 horas después de la inyección en forma libre (flechas), pero se detectan fácilmente si se inyectan con Al-H. Se obtuvieron resultados similares para el compuesto 6, que de nuevo fue indetectable en el músculo después de 24 horas, y tampoco pudo detectarse en los ganglios linfáticos inguinales o en el hígado. Los niveles de compuesto en el músculo 24 horas después de la inyección para diversos compuestos fueron los siguientes (nM):

20

Compuesto	TLR7						TLR2			
	2	5	6	67	68	71	22	72	74	80
	0	0	0	0	0	0	0	0	27843	5072
+ Al-H	20393	4214	2773	2876	502	924	25344	14484	49027	47151

25 Por lo tanto, para todos los compuestos ensayados, la adsorción a Al-H mantiene niveles más altos de los fosfonatos solubles en los sitios de inyección local.

30 En resumen, la adsorción de estos SMIP a Al-H modifica su comportamiento posterior a la administración local y sistémica *in vivo*. La adsorción ha demostrado: (i) aumentar la captación celular de los SMIP, (ii) aumentar el tiempo de residencia de los SMIP en los sitios de inyección intramuscular, donde pueden continuar ejerciendo un efecto inmunoestimulador, (iii) reducir los niveles de activación general de los linfocitos B, minimizando así ventajosamente la inmunoestimulación general y no específica, (iv) disminuir la C<sub>max</sub> y (v) modificar los perfiles de exposición sérica, con el potencial de aumentar o disminuir la exposición sistémica global, consiguiendo así propiedades *in vivo* útiles tal como se desea. Por ejemplo, para inmunizaciones profilácticas generalizadas, puede utilizarse la adsorción para reducir la exposición sistémica y la estimulación de citocinas, o para situaciones inmunoterapéuticas de emergencia, puede utilizarse para aumentar la exposición sistémica. No se ha notificado con anterioridad el uso de la adsorción para modificar el comportamiento *in vivo* de los SMIP de esta manera.

#### 40 **Modelo de desorción *in vivo* (Ejemplo de referencia)**

45 Se sabe que los antígenos pueden desorberse a partir de sales de aluminio después de exponerse a los fluidos linfáticos o intersticiales [89, 90]. Se incubaron a 37°C compuestos de fosfonato adsorbidos a Al-H, con un tampón de histidina, una mezcla de plasma y un tampón de histidina, o con un líquido intersticial simulado (SIF) y se siguió la adsorción durante 5 horas. La figura 13 muestra un perfil de desorción de ejemplo (compuesto 3). Para seis compuestos ensayados, la proporción de antígeno desorbido al cabo de 5 horas fue la siguiente:

50

Compuesto	SIF	Plasma/tamp. His	tamp. His
13*	4%	9%	2%
1	90%	43%	2%
3	100%	49%	5%
2	84%	59%	3%
5	100%	73%	4%
4	100%	81%	4%

55 \* Los resultados con el compuesto 13 no eran fiables.

60 En tampón de histidina solo, todos los fosfonatos presentan una unión a Al-H fuerte, estando sólo un 2%-6% sin unir al cabo de 5 horas. Sin embargo, los fosfonatos se disocian rápidamente del Al-H en plasma, y la disociación era incluso más rápida en SIF. Por otra parte, en el SIF la velocidad de disociación se correlaciona cualitativamente con la exposición sistémica de un compuesto como se observa después de la inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, los compuestos 3 y 4 tenían la mayor exposición sérica y la mayor velocidad de disociación en SIF.

#### 65 **Toxicología (Ejemplo de referencia)**



No hubo problemas tras el estudio de toxicidad y tolerabilidad local con dosis repetidas en ratas macho para el compuesto 2 adsorbido a Al-H. La formulación no se asoció con pérdida de peso corporal, elevación de la temperatura corporal ni observaciones clínicas adversas.

5

**Efecto de la adsorción sobre la inmunogenicidad - meningococo B**

En la referencia 40 se describe una vacuna para el meningococo del serogrupo B ("MenB") fabricada a partir de tres polipéptidos separados ("5CVMB"). Estos polipéptidos pueden adsorberse a Al-H, y se utiliza SDS-PAGE para comprobar si esta adsorción todavía puede producirse después de la adsorción del compuesto 1 al Al-H.

10

Se disuelve compuesto 1 en NaOH 10 mM a una concentración final de 0,5 mg/ml, a continuación se combina con exceso de Al-H en una relación en peso de 1:6 en presencia de histidina 10 mM (concentración final). El pH se ajusta a 9,2 y se agita la mezcla suavemente durante 3 horas a temperatura ambiente, permitiendo que se produzca la reacción. Se centrifuga la mezcla a 5.000 g durante 10 minutos y se descarta el sobrenadante. El sedimento (Al-H con el compuesto 1 adsorbido) se resuspende en el tampón inicial para obtener la concentración de Al-H de partida. Se ajusta el pH a 6,5. A continuación, se utiliza el Al-H modificado para la formulación con los antígenos de MenB. A efectos comparativos, los antígenos también se formulan en paralelo con Al-H "normal".

15

Se centrifugan los antígenos formulados y se ensaya el sobrenadante mediante SDS-PAGE en busca de la presencia de los tres polipéptidos. En ensayos adicionales, se tratan los sobrenadantes con ácido tricloroacético (TCA) para precipitar las proteínas. En ensayos adicionales, se tratan los antígenos formulados con tampón de fosfato 0,5 M antes del análisis, para desorber los antígenos adsorbidos. La figura 6 muestra una SDS-PAGE de los sobrenadantes. La preadsorción del compuesto al Al-H no impide la adsorción de los antígenos de MenB. Estudios adicionales demostraron que la adsorción de antígeno todavía se seguía produciendo incluso con un exceso de 5 veces de los agonista de TLR.

20

Se realizaron ensayos similares con los compuestos 3 y 4. El análisis mediante HPLC muestra que no se observa ninguno de los compuestos en el sobrenadante después de la mezcla con hidróxido de aluminio, pero se recuperan después del tratamiento de desorción con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 M. El análisis mediante SDS-PAGE de la unión del antígeno de MenB a Al-H después de la preadsorción con el compuesto 3 ó 4 vuelve a demostrar que los antígenos se adsorben completamente.

25

Se ensayaron los antígenos de MenB para determinar su poder inmunógeno *in vivo* utilizando un ensayo de anticuerpos bactericidas séricos (SBA). La figura 7 muestra los títulos bactericidas contra la cepa NZ98 de sueros obtenidos después de la inmunización con SCVMB combinado con (a) Al-H solo, (b) Al-H + 25 µg de compuesto 1, (c) Al-H + 100 µg de compuesto 1, (d) compuesto 1 solo, o (e) Al-H y vesículas de membrana externa de MenB. La preadsorción del compuesto 1 a Al-H produce un gran aumento del título de SBA, y mucho mayor de lo que cabría esperar en base a los resultados observados con el compuesto 1 solo. Por lo tanto, aunque la estimulación general de los linfocitos B es reducida por la adsorción (véase más arriba), se potencian las respuestas de anticuerpos específicas para MenB.

30

Se observan efectos similares con otros compuestos modificados con fósforo de la invención. Por ejemplo, la figura 8 muestra los resultados con el compuesto 2 y la figura 9 muestra los resultados con el compuesto 5 (ambos sueros ensayados contra la cepa NZ98). Se seleccionan estos dos compuestos para su posterior evaluación.

35

Se preadsorbe el compuesto 2 a Al-H para investigar la cobertura de cepas de sueros obtenidos después de la inmunización con un 5CVMB modificado en el que la proteína de fusión GNA2091/1870 se sustituye por la proteína "936-10A-10A" descrita en la referencia 91 (SEQ ID N°: 126 en la misma; SEC ID N°: 4 en el presente documento). La siguiente tabla muestra los títulos contra cinco cepas diferentes después de formular los tres polipéptidos con (a) Al-H solo, (b) Al-H + 25 µg de vesículas de membrana externa, (c) Al-H con 100 µg de compuesto 2, (d) Al-H con 25 µg de compuesto 2, (e) Al-H con 5 µg de compuesto 2, o (f) Al-H + un agonista de TLR9 particulado:

40

Se observan efectos similares con otros compuestos modificados con fósforo de la invención. Por ejemplo, la figura 8 muestra los resultados con el compuesto 2 y la figura 9 muestra los resultados con el compuesto 5 (ambos sueros ensayados contra la cepa NZ98). Se seleccionan estos dos compuestos para su posterior evaluación.

45

Se preadsorbe el compuesto 2 a Al-H para investigar la cobertura de cepas de sueros obtenidos después de la inmunización con un 5CVMB modificado en el que la proteína de fusión GNA2091/1870 se sustituye por la proteína "936-10A-10A" descrita en la referencia 91 (SEQ ID N°: 126 en la misma; SEC ID N°: 4 en el presente documento). La siguiente tabla muestra los títulos contra cinco cepas diferentes después de formular los tres polipéptidos con (a) Al-H solo, (b) Al-H + 25 µg de vesículas de membrana externa, (c) Al-H con 100 µg de compuesto 2, (d) Al-H con 25 µg de compuesto 2, (e) Al-H con 5 µg de compuesto 2, o (f) Al-H + un agonista de TLR9 particulado:

50

Se preadsorbe el compuesto 2 a Al-H para investigar la cobertura de cepas de sueros obtenidos después de la inmunización con un 5CVMB modificado en el que la proteína de fusión GNA2091/1870 se sustituye por la proteína "936-10A-10A" descrita en la referencia 91 (SEQ ID N°: 126 en la misma; SEC ID N°: 4 en el presente documento). La siguiente tabla muestra los títulos contra cinco cepas diferentes después de formular los tres polipéptidos con (a) Al-H solo, (b) Al-H + 25 µg de vesículas de membrana externa, (c) Al-H con 100 µg de compuesto 2, (d) Al-H con 25 µg de compuesto 2, (e) Al-H con 5 µg de compuesto 2, o (f) Al-H + un agonista de TLR9 particulado:

55

	MC58	NZ98	961-5945	UK355	599
(a)	16384	1024	16384	256	65536
(b)	32768	4096	8192	2048	>65536
(c)	>65536	16384	32768	4096	>65536
(d)	32768	2048	16384	1024	>65536
(e)	>65536	4096	8192	2048	>65536
(f)	>65536	8192	16384	2048	>65536

60

Por lo tanto, el compuesto 2 mejora la cobertura de cepas en comparación con el Al-H solo.

65

Con un panel más amplio de 17 cepas, el porcentaje de cobertura con títulos > 1024 o > 4096 fue el siguiente, observándose la mejor cobertura utilizando AI-H + compuesto 2:

5

	(a)	(b)	(c)	(f)
>4096	~20%	~60%	~75%	~50%
>1024	~45%	~80%	>95%	~90%

10

También se ensayó la vacuna 5CVMB en ratones CD-1 con los compuestos agonistas de TLR7 6, 67, 68 y 71. Los antígenos se administraron los días 0 y 14 con (a) tampón (b) el compuesto agonista (c) AI-H solo (d) el compuesto agonista + AI-H, o (e) solamente como control positivo para el compuesto 6, resiquimod + AI-H. Los títulos de SBA el día 28 son los siguientes:

15

	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
6	64	282	256	4016	1033
67	64	64	244	949	-
68	64	-	244	404	-
71	64	65	244	1653	-

20

Por lo tanto, la actividad de todos los compuestos agonistas de TLR7 ensayados es potenciada en gran medida por la adsorción a AI-H (el grupo (d) mejor que el grupo (b) en todos los casos), y viceversa (el grupo (d) mejor que el grupo (c)).

25

Además de modificar la retención de los SMIP y la farmacocinética *in vivo*, en algunos casos, la adsorción a sales metálicas insolubles puede mejorar de esta manera la actividad inmunoestimuladora.

**Efecto de la adsorción sobre la inmunogenicidad - *Staphylococcus aureus* (Ejemplo de referencia)**

30

La vacuna "Combo-1" de la referencia 39 incluye una mezcla de cuatro polipéptidos (EsxAB, Sta006, Sta011, y Hla-H35L) y esta combinación es eficaz para la inmunización frente a *S. aureus*. En la referencia 39 se ensayaba la Combo-1 con un adyuvante de AI-H, y se decidió ensayar AI-H en combinación con el compuesto 2 adsorbido. En los experimentos se utilizaron ratones Balb/C (3 inyecciones intramusculares) y se tuvieron en cuenta los títulos de IgG, las respuestas de linfocitos T y la eficacia protectora.

35

La figura 19 muestra los títulos de IgG contra los polipéptidos individuales de Combo-1. Para los cuatro polipéptidos, el título obtenido utilizando la combinación de adyuvante de AI-H/compuesto 2 fue superior al título obtenido utilizando AI-H solo (\*\*, p < 0,05). Se observaron resultados similares utilizando AI-H con 1 µg, 5 µg, 25 µg ó 50 µg del compuesto 2.

40

Para evaluar la calidad de las respuestas de linfocitos T específicas de reclutamiento, se estimularon las células esplénicas de los ratones con los polipéptidos de Combo-1. Se evaluó la producción de citocinas en los linfocitos T CD4+ cooperadores observando la liberación de citocinas. El uso de AI-H/compuesto 2 dio más linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que producen TNF-α, IL-2 e IFN-γ en comparación con la inmunización con antígenos no adyuvados o con antígenos adyuvados con AI-H solo. El porcentaje de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que producen IL-4 e IL-13 fue mayor (aunque no estadísticamente significativo) cuando se utilizaba AI-H en comparación con Combo-1 no adyuvado, pero la inmunización utilizando la combinación AI-H/compuesto 2 reducía este efecto a todas las dosis, excepto la más baja, lo que indica que el efecto polarizador Th2 del AI-H era contrarrestado por el efecto polarizador Th1 del agonista de TLR7.

50

Se evaluó la eficacia protectora frente a *S. aureus* utilizando un modelo de sepsis, monitoreado durante 15 días después de la provocación con la cepa Newman. Se agruparon los resultados de dos experimentos con 10 µg de cada polipéptido. La proporción de animales supervivientes después de 15 días y la mediana de la duración de la supervivencia, fueron:

55

Antígeno	Adyuvante	% de supervivencia	Días de supervivencia
-	-	0	1
-	AI-H	4	1
-	AI-H + 50 µg de comp. 2	12,5	1
Combo-1	-	33,5	7
Combo-1	AI-H	21	7,5
Combo-1	AI-H + 50 µg de comp. 2	97	15
Combo-1	AI-H + 25 µg de comp. 2	75	15
Combo-1	AI-H + 5 µg de comp. 2	67	15
Combo-1	AI-H + 1 µg de comp. 2	66,5	15

60

65

La supervivencia fue mejor, con significación estadística, cuando se utilizaba la combinación Al-H/compuesto 2.

5 Por lo tanto, también se observan con *S. aureus* los efectos positivos sobre la inmunogenicidad frente al meningococo B.

**Efecto de la adsorción sobre la inmunogenicidad - antígenos virales (Ejemplo de referencia)**

10 Se formula la glicoproteína F trimérica del virus respiratorio sincicial (VRS) con diversos adyuvantes, incluidos los compuestos 2, 5 y el ejemplo 161 de la referencia 4 (25 µg ó 100 µg por dosis), con o sin Al-H. Se inmunizan ratones Balb/C (6 por grupo) los días 0 y 21, y se evalúan las respuestas inmunitarias los días 35 y 42. La formulación fue bien tolerada en diversos animales de ensayo. La figura 18 muestra los títulos de IgG específicos de F (GMT, 6 ratones por grupo) 3 semanas después de una dosis única de 2 µg de proteína F trimérica. Los títulos de neutralización el día 35 se muestran en la figura 15, incluidas las comparaciones con otros adyuvantes. El compuesto 2 más Al-H aumentaba los títulos de neutralización y los títulos totales de IgG en comparación con el Al-H solo, y la potenciación fue mayor que la observada para otros agonistas de TLR.

20 Los agonistas de TLR7 descritos anteriormente también eran útiles para potenciar la inmunogenicidad de la gp120 del VIH cuando se adsorbía a Al-H y a continuación se administraba a los monos. Los resultados fueron mejores que con Al-H solo.

25 Se adsorbió el compuesto 2 (10 µg/dosis) a Al-H (100 µg Al<sup>+++</sup>/dosis) y se ensayó como adyuvante con o-gp140ΔV2 del VIH de Sudáfrica, subtipo C, cepa TV1. En las inmunizaciones se utilizaron 10 µg de la proteína en ratones BALB/c (5 por grupo) los días 0 y 21 (50 µl en un solo cuádriceps). También se ensayaron otros adyuvantes. La figura 26 muestra que los mejores resultados se obtuvieron utilizando el compuesto 2 adsorbido a Al-H.

30 Se utilizó Al-H para adyugar la hemaglutinina del virus de la gripe, con o sin compuesto 2 adsorbido. Los animales recibieron 2 dosis de antígeno adyuvado. Como se muestra en la figura 17A, los títulos totales de IgG fueron similares en los dos grupos después de la primera dosis, pero después de la segunda dosis la presencia del compuesto 2 condujo a títulos más elevados. Además, la figura 17B muestra que el Al-H solo favorecía una respuesta de isotipo de IgG1 (de tipo Th2), mientras que la adición de compuesto 2 conducía a una respuesta equilibrada IgG1/IgG2a (Th1/Th2).

35 Por tanto, los efectos positivos sobre la inmunogenicidad con antígenos bacterianos también se observan con los virus.

**Comparación con otros adyuvantes (Ejemplo de referencia)**

40 El producto INFANRIX HEXA™ de GlaxoSmithKline contiene ≥ 30 UI de toxoide diftérico, ≥ 40 UI de toxoide tetánico, un componente de pertussis acelular (25/25/8 µg de PT/FHA/pertactina), 10 µg de HBsAg, un componente IPV trivalente (40/8/32 DU de los tipos 1/2/3) y 10 µg de conjugado Hib. La vacuna se presenta como una vacuna acuosa 5-valente que se utiliza para reconstituir el conjugado Hib a partir de su forma liofilizada, para dar una dosis unitaria acuosa de 0,5 ml para los bebés humanos que contiene 0,95 mg de hidróxido de aluminio y 1,45 mg de fosfato de aluminio.

50 Para investigar adyuvantes alternativos, se adyuvó una mezcla 6-valente con Al-H solo (2 mg/ml, en tampón de histidina), con Al-H adsorbido al compuesto 1 (1 mg/ml) o con la emulsión de aceite-en-agua MF59 (mezclada a un volumen igual con los antígenos). También se preparó un control sin adyuvante. Las concentraciones de antígeno fueron las siguientes (por ml):

DT	TT	PT	FHA	Pertactina
36,9 Lf	14,8 Lf	36,9 µg	36,9 µg	11,8 µg
IPV Tipo 1	IPV Tipo 2	IPV Tipo 3	HBsAg	Hib
59,1 DU	11,8 DU	47,3 DU	14,8 µg	14,8 µg

55 Se utilizaron los mismos adyuvantes también con una mezcla DT-Pa 3-valente (mismas concentraciones).

60 Se midieron la osmolaridad y el pH después de combinar los componentes con el fin de garantizar la aceptabilidad fisiológica. Para todas las composiciones 3-valente, el pH fue de entre 6,2 y 7,1 y la osmolaridad fue de entre 290-320 mOsm/kg. Para todas las composiciones 6-valente, el pH fue de entre 5,5 y 6,8 y la osmolaridad fue de entre 260-320 mOsm/kg. Un control de tampón tenía un pH de 7,3 y 276 mOsm/kg.

65 También se ensayaron la integridad e inmunogenicidad de los antígenos combinados. Ninguno de los antígenos presentó un perfil analítico modificado después de haber sido formulados como combinaciones, es decir, los antígenos y los adyuvantes son físicamente compatibles juntos.

Con el Al-H solo, todos los antígenos se adsorbieron bien al adyuvante. Con el complejo de Al-H + compuesto 1, todos los antígenos se adsorbieron bien, salvo que la pertactina se desorbió parcialmente.

5 Se inmunizaron ratones (hembras Balb/c, 4 semanas de edad) por vía intramuscular con 100 µl de cada composición (es decir, 1/5 de dosis humana) los días 0 y 28. Se recogieron los sueros 14 días después de cada inyección. Después de la segunda inmunización los títulos de anticuerpos IgG fueron los siguientes:

	Sin adyuvante	Al-H	MF59	Al-H/comp. 1	Infanrix-6	
10	<i>Vacunas 3-valente</i>					
	<b>DT</b>	750	21626	15693	23395	-
	<b>TT</b>	13120	17868	22458	23131	-
	<b>Pertactina</b>	639	7209	10258	12857	-
	<b>PT</b>	2501	8270	7212	9938	-
15	<b>FHA</b>	3982	12057	14098	23008	-
	<i>Vacuna 6-valente</i>					
	<b>DT</b>	1751	18914	13982	23102	21581
	<b>TT</b>	12729	16756	22229	23267	15998
20	<b>Pertactina</b>	333	6299	9363	5153	10809
	<b>PT</b>	3069	3384	4823	6484	6052
	<b>FHA</b>	4558	7206	16201	19383	11051
	<b>Hib</b>	177	813	1266	2153	1269
	<b>HBsAg</b>	1058	1598	2288	4501	1113

25 Por lo tanto, para todos estos antígenos la inclusión de un adyuvante aumentaba los títulos de anticuerpos IgG. Los mejores títulos se observaron cuando se utilizó el complejo de Al-H y el compuesto 1. El siguiente mejor fue con MF59, que dio mejores resultados que el hidróxido de aluminio solo. Los títulos obtenidos utilizando el complejo adsorbido fueron mejores para todos los antígenos que los observados con Infanrix Hexa, a excepción de la pertactina.

30 Además, los datos demuestran que se mantienen los buenos resultados conseguidos con la vacuna 3-valente incluso después añadirse IPV, Hib y HBsAg.

35 También se investigaron las respuestas de IgG por subclase. Para la mayoría de los antígenos en las vacunas 6-valente, los adyuvantes tuvieron poco efecto sobre los títulos de IgG1, pero sí aumentaron los títulos de IgG2a e IgG2b. Los mejores títulos de IgG2a e IgG2b se obtuvieron con el complejo adsorbido, y a continuación con MF59.

40 El aumento de los títulos observado con el complejo en comparación con el Al-H solo, o con la mezcla de sales de aluminio observado en Infanrix Hexa™, significa que la cantidad total de aluminio por dosis puede reducirse al tiempo que se mantiene la potenciación de la respuesta inmunitaria.

**Reducción de las dosis de antígeno (Ejemplo de referencia)**

45 Se diseñaron experimentos para investigar si podría utilizarse el complejo adyuvante para reducir la cantidad de antígeno por dosis. Se realizaron diluciones con factor de dilución de 10, 50 y 100 (con respecto a la dosificación humana, es decir, para administrar 1 µg, 0,2 µg ó 0,1 µg de HBsAg a cada ratón por dosis de 100 µl) de las combinaciones de antígenos 6-valente, al tiempo que se mantenía la concentración de adyuvante.

50 Para todas las composiciones 6-valente, el pH fue de entre 6,1 y 7,0 y la osmolaridad fue de entre 275-320 mOsm/kg. Un control de tampón tenía un pH de 7,3 y 285 mOsm/kg.

55 Se inmunizaron los ratones de la misma manera que se ha analizado anteriormente. Los títulos totales de IgG sérica después de 2 inmunizaciones fueron los siguientes:

60

65

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50

	Sin adyuvante			Al-H			MF59			Al-H + comp. 1		
	1/10	1/50	1/100	1/10	1/50	1/100	1/10	1/50	1/100	1/10	1/50	1/100
DT	459	2043	137	18357	13106	7541	17431	6003	8736	21913	16807	13724
TT	7602	7929	1700	17595	9664	5531	22791	12062	13015	23570	12237	13183
Pertactina	827	2154	341	10880	8135	4181	17159	10591	7288	17098	10748	8952
PT	3612	5645	2129	5287	3266	1068	7200	3659	5493	9051	4203	2717
FHA	2305	4161	101	8997	4471	1442	19197	5179	4492	22151	8293	3252
Hib	171	352	109	1380	796	251	3147	573	2415	3056	1440	1815
HBsAg	525	412	129	1034	685	226	4885	1103	1983	5270	1526	950

Por lo tanto, la presencia de adyuvantes permitía una reducción de la dosis de 5 veces o de 10 veces, al tiempo que se mantenían los títulos de IgG, que son comparables o superiores a los antígenos no adyuvados. MF59 y el complejo adsorbido en particular son útiles para moderar la dosis de antígenos de esta manera.

55

**Dosificación de adyuvante (Ejemplo de referencia)**

Con la dilución del antígeno con factor de dilución de 100, también se redujo la cantidad de adyuvante. Se preparó el complejo de Al-H y compuesto 1 a 3 potencias, que tenían 2 mg/ml de Al-H, con 5 µg, 25 µg ó 100 µg de compuesto 1 por dosis. A efectos comparativos, se ensayó una dosis de antígeno 1:100 en forma no adyuvada o con Al-H solo. También se utilizó una dilución 1:100 de INFANRIX HEXA a efectos comparativos.

60

Para todas las composiciones 6-valente, el pH fue de entre 6,2 y 7,3 y la osmolaridad fue de entre 270-320 mOsm/kg. Un control de tampón tenía un pH de 7,3 y 280 mOsm/kg.

65

Los ratones se inmunizaron como antes. Los títulos totales de IgG sérica después de 2 inmunizaciones

fueron los siguientes:

	Sin adyuvante	Infanrix Hexa	Al-H	Al-H + compuesto 1			
				100	25	5	
5	DT	584	6282	10849	21571	20865	11788
	TT	3426	5415	6857	16041	15124	6236
	Pertactina	48	3017	6053	6158	6697	3815
	PT	3351	1751	2699	2476	2696	3079
10	FHA	262	7886	5626	7369	8634	6120
	Hib	126	109	310	936	792	390
	HBsAg	88	240	369	4062	2308	1154

15 Por lo tanto, cantidades menores del complejo aún conservan buena capacidad adyuvante y pueden inducir mayores títulos de anticuerpos IgG que los inducidos por las formulaciones de antígeno 6-valente no adyuvado. Al reducir la cantidad de adyuvante, al tiempo que se mantiene la eficacia inmunitaria, puede mejorarse el perfil de seguridad de una vacuna, lo que es especialmente importante en el ámbito pediátrico.

#### 20 ***Dilución de adyuvante (Ejemplo de referencia)***

25 Se adsorbió compuesto 2 a Al-H como se ha descrito anteriormente. A continuación, se mezcló este material adsorbido con Al-H normal. La citometría de flujo mostró un cambio de fluorescencia de toda la población de Al-H, lo que indica la redistribución del compuesto adsorbido sobre el nuevo Al-H.

30 Para estudiar el potencial de redistribución, se preparó un experimento de dos cámaras. Se separaron las dos cámaras mediante una membrana con un corte de 8 kDa-10 kDa. En un experimento de control, se colocó Al-H en la cámara 1 y se colocó el mismo volumen de PBS en la cámara 2. No se observó ninguna fuga de Al-H de la cámara 1 a la cámara 2. En el experimento de ensayo, se colocó compuesto 2 + Al-H en la cámara 1 y se colocó el mismo volumen de Al-H en la cámara 2. La citometría de flujo, en base a la fluorescencia intrínseca del compuesto 2, mostró que el compuesto había pasado de la cámara 1 a la cámara 2.

35 Se realizaron experimentos similares con disacárido hexaacilo fosforilado, un análogo sintético del monofosforil lípido A (MPL), utilizando RMN. Los experimentos demostraron que el MPL puede pasar a través de la membrana desde la cámara 1 y adsorberse al Al-H en la cámara 2.

40 Por lo tanto, puede prepararse una mezcla a granel de Al-H y un SMIP adsorbido a una concentración de SMIP alta, y puede diluirse este volumen con Al-H normal para dar una potencia de SMIP deseada. Este sistema puede simplificar la fabricación de varias potencias diferentes de adyuvante en el día a día a partir de un solo volumen.

#### ***Mezcla extemporánea de antígeno y adyuvante (Ejemplo de referencia)***

45 Se preparó la combinación de 5CVMB modificado en forma liofilizada [92] con sacarosa al 10%, 3,84 mg/ml de NaCl y tampón de fosfato 10 mM (pH 7,0). Se reconstituyó este material con un componente de adyuvante acuoso con 500 µg/ml de compuesto 2, 3 mg/ml de Al-H, sacarosa al 2%, 6,25 mg/ml de NaCl y tampón de histidina 10 mM (pH 6,3).

50 Se comparó este material con una formulación acuosa de los mismos materiales (500 µg/ml de compuesto 2, tampón de histidina 10 mM pH 6,3, 6,25 mg/ml de NaCl, sacarosa al 2%, 3 mg/ml de Al-H).

El agonista de TLR7 permaneció adsorbido al Al-H después de la mezcla con los antígenos liofilizados.

55 Se comprobó la adsorción de antígeno después de la mezcla (tiempo 0) y al cabo de 24 horas de almacenamiento a 2°C-8°C o a temperatura ambiente. La adsorción de antígeno fue comparable en la formulación liofilizada/reconstituida y en la formulación totalmente acuosa. Ambas formulaciones fueron estables durante 24 horas.

60 Por lo tanto, antígenos y el adyuvante pueden almacenarse por separado para la mezcla extemporánea en el momento de uso.

65 Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente y que pueden realizarse modificaciones mientras permanezcan dentro del alcance de la invención, tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

## REFERENCIAS

- 5 [1] US-4.666.886.  
 [2] WO2009/118296.  
 [3] WO2008/005555.  
 [4] WO2009/111337.  
 [5] WO2009/067081.  
 [6] WO2007/040840.  
 [7] WO2010/014913.
- 10 [8] Burrell *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2599-603.  
 [9] PCT/US2011/029661.  
 [10] WO2011/027222.  
 [11] WO2007/034917.  
 [12] WO2007/034173.
- 15 [13] WO2008/114817.  
 [14] US2009/0105212.  
 [15] US2009/0118263.  
 [16] US2009/0143400.  
 [17] US2009/0192153.
- 20 [18] WO2007/093901.  
 [19] WO2009/019553.  
 [20] US2009/0221631.  
 [21] WO2008/004948.  
 [22] WO2008/135791.
- 25 [23] US2009/0099216.  
 [24] US2009/0202484.  
 [25] WO2008/101867.  
 [26] WO2010/077613.  
 [27] US2010/0143301.
- 30 [28] Iyer *et al.* (2004) *Vaccine* 22:1475-9.  
 [29] Morefield *et al.* (2005) *Vaccine* 23:1502-6.  
 [30] Levesque y de Alwis (2005) *Human Vaccines* 1:70-3.  
 [31] Romero Méndez *et al.* (2007) *Vaccine* 25:825-33.
- 35 [32] *Vaccine Design*. (1995) eds. Powell y Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.  
 [33] Clausi *et al.* (2008) *J Pharm Sci* DOI 10.1002/jps.21390.  
 [34] Treanor *et al.* (1996) *J Infect Dis* 173:1467-70.  
 [35] Keitel *et al.* (1996) *Clin Diagn Lab Immunol* 3:507-10.  
 [36] WO03/097091.
- 40 [37] Cassone y Torosantucci (2006) *Expert Rev Vaccines* 5:859-67.  
 [38] WO2010/140119.  
 [39] WO2010/119343.  
 [40] Giuliani *et al.* (2006) *Proc Natl Acad Sci U SA*. 103:10834-9.  
 [41] WO95/27787.  
 [42] WO03/010317.
- 45 [43] WO2007/110700.  
 [44] WO2006/138004.  
 [45] WO2005/084306.  
 [46] WO2005/002619.  
 [47] WO03/049762.
- 50 [48] WO02/02606.  
 [49] WO00/37494.  
 [50] WO2008/020330.  
 [51] WO2006/091517.  
 [52] WO2006/089264.
- 55 [53] Covacci y Rappuoli (2000) *J. Exp. Med.* 19:587-592.  
 [54] WO93/18150.  
 [55] Covacci *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5791-5795.  
 [56] Tummuru *et al.* (1994) *Infect. Immun.* 61:1799-1809.  
 [57] Marchetti *et al.* (1998) *Vaccine* 16:33-37.
- 60 [58] Telford *et al.* (1994) *J. Exp. Med.* 179:1653-1658.  
 [59] Evans *et al.* (1995) *Gene* 153:123-127.  
 [60] WO96/01272 y WO96/01273, especialmente la SEQ ID NO:6.  
 [61] WO97/25429.
- 65 [62] Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.  
 [63] Nencioni *et al.* (1991) *Infect Immun.* 59(2): 625-30.  
 [64] Dasarai *et al.* (2011) *J Gen Virol* PMID: 21307228.

5 [65] Zhang *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:39577-85.  
 [66] Earl *et al.* (2001) J Virol 75:645-53.  
 [67] Barnett *et al.* (2001) J Virol 75:5526-40.  
 [68] MMWR Morb Mortal Wkly Rep enero 1998 16;47(1):12, 19.  
 [69] Harper *et al.* (2004) Lancet 364(9447):1757-65.  
 [70] US 6.699.474.  
 [71] WO2007/060548.  
 [72] WO2010/144734.  
 [73] WO2004/032958.  
 10 [74] Rosenberg *et al.* (2010) J Immunol 184:136.20.  
 [75] WO2010/003009.  
 [76] W02009/081172.  
 [77] Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 2000; 20ª edición, ISBN: 0683306472)  
 [78] De Libero *et al.*, Nature Reviews Immunology, 2005, 5: 485-496.  
 15 [79] Patente de EE.UU. 5.936.076.  
 [80] Oki *et al.*, J. Clin. Investig., 113: 1631-1640.  
 [81] US2005/0192248.  
 [82] Yang *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed., 2004, 43: 3818-3822.  
 [83] WO2008/047174.  
 20 [84] WO2008/047249.  
 [85] WO2005/102049.  
 [86] Goff *et al.*, J. Am. Chem., Soc., 2004, 126: 13602-13603.  
 [87] WO03/105769.  
 [88] US2011/0053893.  
 25 [89] Chang *et al.* (2001) Vaccine 19:2884-9.  
 [90] Shi *et al.* (2002) Vaccine 20:80-5.  
 [91] WO2011/024072.  
 [92] WO2009/050586.  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65



LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Novartis AG  
IRM LLC
- <120> FORMULACIÓN DE INMUNOPOTENCIADORES
- <130> PAT054166-WO-PCT
- 10 <140> PCT/US2011/\_\_\_\_\_
- <141> 01-09-2011
- <150> US 61/379.126
- 15 <151> 01-09-2010
- <150> US 61/448.394
- <151> 02-03-2011
- 20 <150> US 61/466.887
- <151> 23-03-2011
- <160> 5
- 25 <170> SeqWin2010, versión 1.0
- <210> 1
- <211> 327
- <212> PRT
- 30 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Inmunógeno para *Neisseria meningitidis*
- 35 <400> 1

Ala Thr Asn Asp Asp Val Lys Lys Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala  
1 5 10 15

Ala Ala Tyr Asn Asn Gly Gln Glu Ile Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu  
20 25 30

Thr Ile Tyr Asp Ile Asp Glu Asp Gly Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala  
35 40 45

Thr Ala Ala Asp Val Glu Ala Asp Asp Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys  
50 55 60

Lys Val Val Thr Asn Leu Thr Lys Thr Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn  
65 70 75 80

Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr  
85 90 95

Thr Lys Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala  
100 105 110

Leu Asp Ala Thr Thr Asn Ala Leu Asn Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr  
115 120 125

Thr Phe Ala Glu Glu Thr Lys Thr Asn Ile Val Lys Ile Asp Glu Lys  
130 135 140

Leu Glu Ala Val Ala Asp Thr Val Asp Lys His Ala Glu Ala Phe Asn  
145 150 155 160

Asp Ile Ala Asp Ser Leu Asp Glu Thr Asn Thr Lys Ala Asp Glu Ala

ES 2 458 355 T3

5 Val Lys Thr Ala Asn Glu Ala Lys Gln Thr Ala Glu Glu Thr Lys Gln  
180 185 190

Asn Val Asp Ala Lys Val Lys Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gly Lys Ala  
195 200 205

10 Glu Ala Ala Ala Gly Thr Ala Asn Thr Ala Ala Asp Lys Ala Glu Ala  
210 215 220

Val Ala Ala Lys Val Thr Asp Ile Lys Ala Asp Ile Ala Thr Asn Lys  
225 230 235 240

15 Asp Asn Ile Ala Lys Lys Ala Asn Ser Ala Asp Val Tyr Thr Arg Glu  
245 250 255

Glu Ser Asp Ser Lys Phe Val Arg Ile Asp Gly Leu Asn Ala Thr Thr  
260 265 270

20 Glu Lys Leu Asp Thr Arg Leu Ala Ser Ala Glu Lys Ser Ile Ala Asp  
275 280 285

His Asp Thr Arg Leu Asn Gly Leu Asp Lys Thr Val Ser Asp Leu Arg  
290 295 300

25 Lys Glu Thr Arg Gln Gly Leu Ala Glu Gln Ala Ala Leu Ser Gly Leu  
305 310 315 320

Phe Gln Pro Tyr Asn Val Gly  
325

35 <210> 2  
<211> 644  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Inmunógeno para *Neisseria meningitidis* - proteína de fusión

40 <400> 2

45 Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala  
1 5 10 15

Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro  
20 25 30

50 Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Ala Gln Gly Gly Gln  
35 40 45

Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala  
50 55 60

55 Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Ala Gln Asn Asp Met  
65 70 75 80

Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu Thr Pro Asn His Thr Pro  
85 90 95

60 Ala Ser Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu Asn Gln Ala Pro Asp Ala  
100 105 110

65 Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Thr Ala  
115 120 125

Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Gly Glu Asn Ala Gly  
 130 135 140  
 5 Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Thr Ala  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Ser Ala Thr Asn Ser  
 165 170 175  
 10 Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly Asn Ser Val Val Ile Asp  
 180 185 190  
 Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys  
 195 200 205  
 15 Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe  
 210 215 220  
 Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly  
 225 230 235 240  
 20 Lys Asn Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Ser  
 245 250 255  
 Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys Pro Lys  
 260 265 270  
 25 Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser  
 275 280 285  
 30 Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu  
 290 295 300  
 Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile  
 305 310 315 320  
 35 Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys  
 325 330 335  
 Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ser Lys  
 340 345 350  
 40 Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His  
 355 360 365  
 Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro Ser Arg Gly Arg Phe Ala  
 370 375 380  
 45 Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser  
 385 390 395 400  
 50 Gly Asp Gly Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp  
 405 410 415  
 Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val  
 420 425 430  
 55 Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr  
 435 440 445  
 Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala  
 450 455 460  
 60 Gly Lys Lys Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Thr Tyr Lys  
 465 470 475 480  
 65

5 Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile Asp His Phe Asn  
485 490 495

Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu  
500 505 510

10 Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val  
515 520 525

Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp His Leu Lys Ser  
530 535 540

15 Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser  
545 550 555 560

Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys Leu Val Ser Val Asp Gly Asn  
565 570 575

20 Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys  
580 585 590

Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly  
595 600 605

25 Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu  
610 615 620

30 Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu  
625 630 635 640

Ala Ala Lys Gln

35 <210> 3  
<211> 434  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Inmunógeno para *Neisseria meningitidis* - proteína de fusión

<400> 3

45 Met Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala Val Gly Ala Lys Ser Ala  
1 5 10 15

50 Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asp Asp Asn Val Met Ala  
20 25 30

Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Asn Gln  
35 40 45

55 Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val Val Gly Tyr Asp Arg His  
50 55 60

Leu Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe Val  
65 70 75 80

60 Gly Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala Glu Gly Val Tyr Asn Tyr  
85 90 95

Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala Gly Asp Ile Ala Gly Asp  
100 105 110

65 Thr Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr Leu Leu Gly Ile Ser Pro

ES 2 458 355 T3

		115				120						125			
5		Ala Thr Arg	Ala Arg Val	Lys Ile Val	Thr Tyr Gly	Asn Val Thr	Tyr	Gly	Asn Val Thr	Tyr					
		130		135		140									
		Val Met Gly	Ile Leu Thr	Pro Glu Glu	Gln Ala Gln	Ile Thr Gln	Lys	Val	Ile Thr Gln	Lys					
		145		150		155									
10		Val Ser Thr	Thr Val Gly	Val Gln Lys	Val Ile Thr	Leu Tyr Gln	Asn								
			165		170										
		Tyr Val Gln	Arg Gly Ser	Gly Gly Gly	Gly Val Ala	Ala Ala Asp	Ile Gly								
			180		185										
15		Ala Gly Leu	Ala Asp Ala	Leu Thr Ala	Pro Leu Asp	His Lys Asp	Lys								
			195		200										
		Gly Leu Gln	Ser Leu Thr	Leu Asp Gln	Ser Val Arg	Lys Asn Glu	Lys								
			210		215										
20		Leu Lys Leu	Ala Ala Gln	Gly Ala Glu	Lys Thr Tyr	Gly Asn Gly	Asp								
			225		230										
		Ser Leu Asn	Thr Gly Lys	Leu Lys Asn	Asp Lys Val	Ser Arg Phe	Asp								
			245		250										
25		Phe Ile Arg	Gln Ile Glu	Val Asp Gly	Gln Leu Ile	Thr Leu Glu	Ser								
			260		265										
		Gly Glu Phe	Gln Val Tyr	Lys Gln Ser	His Ser Ala	Leu Thr Ala	Phe								
			275		280										
30		Gln Thr Glu	Gln Ile Gln	Asp Ser Glu	His Ser Gly	Lys Met Val	Ala								
			290		295										
		Lys Arg Gln	Phe Arg Ile	Gly Asp Ile	Ala Gly Glu	His Thr Ser	Phe								
			305		310										
		Asp Lys Leu	Pro Glu Gly	Gly Arg Ala	Thr Tyr Arg	Gly Thr Ala	Phe								
			325		330										
40		Gly Ser Asp	Asp Ala Gly	Gly Lys Leu	Thr Tyr Thr	Ile Asp Phe	Ala								
			340		345										
		Ala Lys Gln	Gly Asn Gly	Lys Ile Glu	His Leu Lys	Ser Pro Glu	Leu								
			355		360										
45		Asn Val Asp	Leu Ala Ala	Ala Asp Ile	Lys Pro Asp	Gly Lys Arg	His								
			370		375										
		Ala Val Ile	Ser Gly Ser	Val Leu Tyr	Asn Gln Ala	Glu Lys Gly	Ser								
			385		390										
50		Tyr Ser Leu	Gly Ile Phe	Gly Gly Lys	Ala Gln Glu	Val Ala Gly	Ser								
			405		410										
		Ala Glu Val	Lys Thr Val	Asn Gly Ile	Arg His Ile	Gly Leu Ala	Ala								
			420		425										
55		Lys Gln													

60 <210> 4  
 <211> 686  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>  
 <223> Inmunógeno para *Neisseria meningitidis* - proteína de fusión

<400> 4

5 Met Val Ser Ala Val Ile Gly Ser Ala Ala Val Gly Ala Lys Ser Ala  
1 5 10 15

Val Asp Arg Arg Thr Thr Gly Ala Gln Thr Asp Asp Asn Val Met Ala  
20 25 30

10 Leu Arg Ile Glu Thr Thr Ala Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Asn Gln  
35 40 45

Thr Lys Gly Tyr Thr Pro Gln Ile Ser Val Val Gly Tyr Asp Arg His  
50 55 60

15 Leu Leu Leu Leu Gly Gln Val Ala Thr Glu Gly Glu Lys Gln Phe Val  
65 70 75 80

20 Gly Gln Ile Ala Arg Ser Glu Gln Ala Ala Glu Gly Val Tyr Asn Tyr  
85 90 95

Ile Thr Val Ala Ser Leu Pro Arg Thr Ala Gly Asp Ile Ala Gly Asp  
100 105 110

25 Thr Trp Asn Thr Ser Lys Val Arg Ala Thr Leu Leu Gly Ile Ser Pro  
115 120 125

Ala Thr Arg Ala Arg Val Lys Ile Val Thr Tyr Gly Asn Val Thr Tyr  
130 135 140

30 Val Met Gly Ile Leu Thr Pro Glu Glu Gln Ala Gln Ile Thr Gln Lys  
145 150 155 160

Val Ser Thr Thr Val Gly Val Gln Lys Val Ile Thr Leu Tyr Gln Asn  
165 170 175

35 Tyr Val Gln Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly  
180 185 190

Ala Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys  
195 200 205

40 Gly Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys  
210 215 220

45 Leu Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp  
225 230 235 240

Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp  
245 250 255

50 Phe Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser  
260 265 270

Gly Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe  
275 280 285

55 Gln Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala  
290 295 300

Lys Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe  
305 310 315 320

60

65

5 Asn Gln Leu Pro Asp Gly Lys Ala Glu Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly  
 325 330 335  
 Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Thr Lys  
 340 345 350  
 10 Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn  
 355 360 365  
 Val Glu Leu Ala Ser Ala Glu Ile Lys Ala Asp Gly Lys Ser His Ala  
 370 375 380  
 15 Val Ile Leu Gly Asp Val Arg Tyr Gly Ser Glu Glu Lys Gly Ser Tyr  
 385 390 395 400  
 Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Arg Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala  
 405 410 415  
 20 Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys  
 420 425 430  
 Gln Gly Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu  
 435 440 445  
 25 Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly Leu Gln  
 450 455 460  
 Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu Lys Leu  
 465 470 475 480  
 Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser Leu Asn  
 485 490 495  
 35 Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe Ile Arg  
 500 505 510  
 Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly Glu Phe  
 515 520 525  
 40 Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln Thr Glu  
 530 535 540  
 Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys Arg Gln  
 545 550 555 560  
 Phe Arg Ile Gly Asp Leu Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu  
 565 570 575  
 50 Pro Asp Gly Lys Ala Glu Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly Ser Asp Asp  
 580 585 590  
 Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly  
 595 600 605  
 55 Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn Val Glu Leu  
 610 615 620  
 Ala Ser Ala Glu Ile Lys Ala Asp Gly Lys Ser His Ala Val Ile Leu  
 625 630 635 640  
 60 Gly Asp Val Arg Tyr Gly Ser Glu Glu Lys Gly Ser Tyr Ser Leu Gly  
 645 650 655  
 65 Ile Phe Gly Gly Arg Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala Glu Val Lys





ES 2 458 355 T3

5 Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp His Lys Asp Lys Gly  
275 280 285

10 Leu Gln Ser Leu Thr Leu Asp Gln Ser Val Arg Lys Asn Glu Lys Leu  
290 295 300

15 Lys Leu Ala Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Tyr Gly Asn Gly Asp Ser  
305 310 315 320

20 Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn Asp Lys Val Ser Arg Phe Asp Phe  
325 330 335

25 Ile Arg Gln Ile Glu Val Asp Gly Gln Leu Ile Thr Leu Glu Ser Gly  
340 345 350

30 Glu Phe Gln Val Tyr Lys Gln Ser His Ser Ala Leu Thr Ala Phe Gln  
355 360 365

35 Thr Glu Gln Ile Gln Asp Ser Glu His Ser Gly Lys Met Val Ala Lys  
370 375 380

40 Arg Gln Phe Arg Ile Gly Asp Ile Ala Gly Glu His Thr Ser Phe Asp  
385 390 395 400

45 Lys Leu Pro Glu Gly Gly Arg Ala Thr Tyr Arg Gly Thr Ala Phe Gly  
405 410 415

50 Ser Asp Asp Ala Gly Gly Lys Leu Thr Tyr Thr Ile Asp Phe Ala Ala  
420 425 430

55 Lys Gln Gly Asn Gly Lys Ile Glu His Leu Lys Ser Pro Glu Leu Asn  
435 440 445

60 Val Asp Leu Ala Ala Ala Asp Ile Lys Pro Asp Gly Lys Arg His Ala  
450 455 460

65 Val Ile Ser Gly Ser Val Leu Tyr Asn Gln Ala Glu Lys Gly Ser Tyr  
465 470 475 480

70 Ser Leu Gly Ile Phe Gly Gly Lys Ala Gln Glu Val Ala Gly Ser Ala  
485 490 495

75 Glu Val Lys Thr Val Asn Gly Ile Arg His Ile Gly Leu Ala Ala Lys  
500 505 510

80 Gln Gly Ser Gly Pro Asp Ser Asp Arg Leu Gln Gln Arg Arg Val Ala  
515 520 525

85 Ala Asp Ile Gly Thr Gly Leu Ala Asp Ala Leu Thr Ala Pro Leu Asp  
530 535 540

90 His Lys Asp Lys Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ser Ile Pro  
545 550 555 560

95 Gln Asn Gly Thr Leu Thr Leu Ser Ala Gln Gly Ala Glu Lys Thr Phe  
565 570 575

100 Lys Ala Gly Asp Lys Asp Asn Ser Leu Asn Thr Gly Lys Leu Lys Asn  
580 585 590

105 Asp Lys Ile Ser Arg Phe Asp Phe Val Gln Lys Ile Glu Val Asp Gly  
595 600 605

110 Gln Thr Ile Thr Leu Ala Ser Gly Glu Phe Gln Ile Tyr Lys Gln Asn  
610 615 620

5 His Ser Ala Val Val Ala Leu Gln Ile Glu Lys Ile Asn Asn Pro Asp  
625 630 635 640

Lys Thr Asp Ser Leu Ile Asn Gln Arg Ser Phe Leu Val Ser Gly Leu  
645 650 655

10 Gly Gly Glu His Thr Ala Phe Asn Gln Leu Pro Gly Gly Lys Ala Glu  
660 665 670

Tyr His Gly Lys Ala Phe Ser Ser Asp Asp Pro Asn Gly Arg Leu His  
675 680 685

15 Tyr Ser Ile Asp Phe Thr Lys Lys Gln Gly Tyr Gly Arg Ile Glu His  
690 695 700

Leu Lys Thr Leu Glu Gln Asn Val Glu Leu Ala Ala Ala Glu Leu Lys  
705 710 715 720

20 Ala Asp Glu Lys Ser His Ala Val Ile Leu Gly Asp Thr Arg Tyr Gly  
725 730 735

Ser Glu Glu Lys Gly Thr Tyr His Leu Ala Leu Phe Gly Asp Arg Ala  
740 745 750

25 Gln Glu Ile Ala Gly Ser Ala Thr Val Lys Ile Gly Glu Lys Val His  
755 760 765

30 Glu Ile Gly Ile Ala Gly Lys Gln  
770 775

35

40

45

50

55

60

65

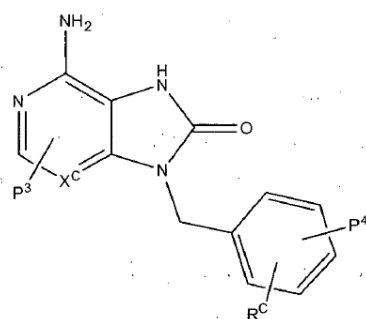
REIVINDICACIONES

1. Agonista de TLR7 seleccionado de entre los compuestos según cualquiera de fórmulas (C), (D), (E) o (H):

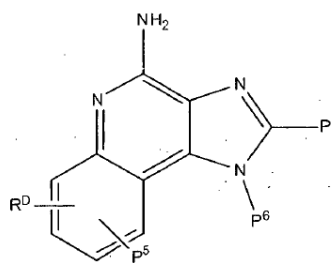
5

10

15



(C)

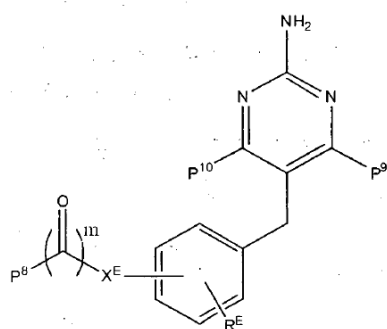


(D)

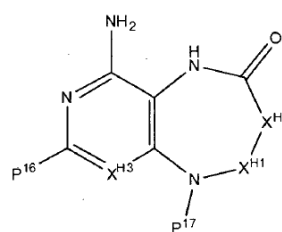
20

25

30



(E)



(H)

35

40 en las que:

(a) P<sup>3</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, CF<sub>3</sub> y -((CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>O)<sub>q</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>O<sub>s</sub>- e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>); y P<sup>4</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>); a condición de que al menos uno de entre P<sup>3</sup> y P<sup>4</sup> sea -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>),

45

(b) P<sup>5</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>); P<sup>6</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados de entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> y OH, e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>);

50

y P<sup>7</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -((CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>O)<sub>q</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>O<sub>s</sub>-, -NH alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>); a condición de que al menos uno de entre P<sup>5</sup>, P<sup>6</sup> y P<sup>7</sup> sea -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>);

55

(c) P<sup>8</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -NH alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cada uno opcionalmente sustituido con OH, e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>); y cada uno de P<sup>9</sup> y P<sup>10</sup> está seleccionado independientemente de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -NH alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cada uno opcionalmente sustituido con OH y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>); a condición de que al menos uno de entre P<sup>8</sup>, P<sup>9</sup> o P<sup>10</sup> sea -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>);

60

(d) P<sup>16</sup> y cada P<sup>18</sup> está cada uno seleccionado independientemente de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>); P<sup>17</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, heteroarilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> heteroarilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>) e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>), cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 2 sustituyentes seleccionados de entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o heterociclo, a condición de que al menos uno de entre P<sup>16</sup>, P<sup>17</sup> o un P<sup>18</sup> contenga un resto -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>);

65

R<sup>X</sup> y R<sup>Y</sup> están seleccionados independientemente de entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

cada uno de R<sup>C</sup>, R<sup>D</sup> y R<sup>H</sup> está seleccionado independientemente de entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

X<sup>C</sup> está seleccionado de entre CH y N;

R<sup>E</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, C(O)alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno y -((CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>O)<sub>q</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-;

70

X<sup>E</sup> está seleccionado de entre un enlace covalente, CR<sup>E2</sup>R<sup>E3</sup> y NR<sup>E4</sup>;

R<sup>E2</sup>, R<sup>E3</sup> y R<sup>E4</sup> están seleccionados independientemente de entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;

$X^{H1}-X^{H2}$  está seleccionado de entre  $-\text{CR}^{H2}\text{R}^{H3}$ -,  $-\text{CR}^{H2}\text{R}^{H3}-\text{CR}^{H2}\text{R}^{H3}$ -,  $-\text{C}(\text{O})\text{CR}^{H2}\text{R}^{H3}$ -,  $-\text{C}(\text{O})\text{CR}^{H2}\text{R}^{H3}$ -,  $-\text{CR}^{H2}\text{R}^{H3}\text{C}(\text{O})$ -,  $-\text{NR}^{H4}\text{C}(\text{O})$ -,  $\text{C}(\text{O})\text{NR}^{H4}$ -,  $\text{CR}^{H2}\text{R}^{H3}\text{S}(\text{O})_2$  y  $-\text{CR}^{H2}=\text{CR}^{H2}$ -;

cada uno de  $\text{R}^{H2}$ ,  $\text{R}^{H3}$  y  $\text{R}^{H4}$  está seleccionado independientemente de entre H, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  y  $\text{P}^{18}$ ;

$X^{H3}$  está seleccionado de entre N y CN;

5 X está seleccionado de entre un enlace covalente, O y NH;

Y está seleccionado de entre un enlace covalente, O, C(O), S y NH;

L está seleccionado de entre un enlace covalente alquilenilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , alquilenilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ , arileno, heteroarileno, alquilenoxi  $\text{C}_1\text{-C}_6$  y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}(\text{CH}_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_4$ ,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  y  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ;

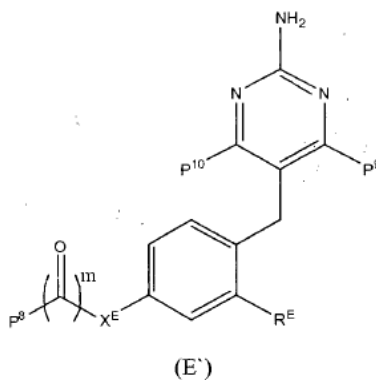
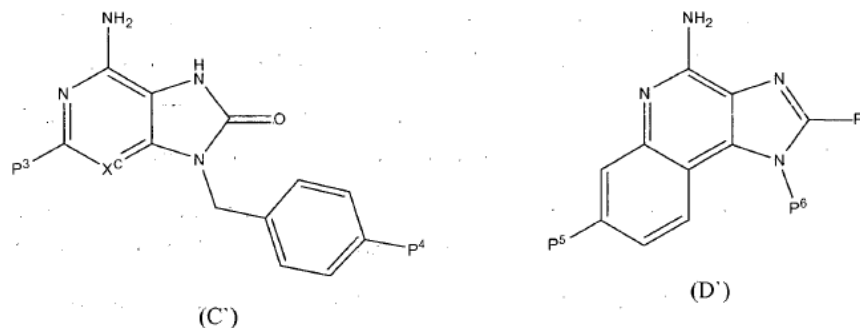
10 m está seleccionado de entre 0 ó 1;

cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2, 3, 4, 5 y 6;

q está seleccionado de entre 1, 2, 3 y 4; y

s está seleccionado de entre 0 y 1.

15 2. Agonista de TLR7 según la reivindicación 1, seleccionado de entre los compuestos de fórmulas (C), (D) y (E), en el que los compuestos tienen estructuras según las fórmulas (C'), (D') y (E'), que se muestran a continuación:



50 en las que los sustituyentes P<sup>3</sup>, P<sup>4</sup>, X<sup>C</sup>, P<sup>5</sup>, P<sup>6</sup>, P<sup>7</sup>, P<sup>8</sup>, P<sup>9</sup>, P<sup>10</sup>, X<sup>E</sup> y R<sup>E</sup> son como se definen en la reivindicación 1.

3. Agonista de TLR7 según las reivindicaciones 1 ó 2, seleccionado de entre las fórmulas (C) o (C'), en las que P<sup>3</sup> está seleccionado de entre alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ ,  $\text{CF}_3$  y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{O}_s-$  e  $-\text{Y-L-X-P}(\text{O})(\text{OR}^X)(\text{OR}^Y)$ ; P<sup>4</sup> está seleccionado de entre -alquilarilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  e  $-\text{Y-L-X-P}(\text{O})(\text{OR}^X)(\text{OR}^Y)$ ; X<sup>C</sup> es CH; X es un enlace covalente; L está seleccionado de entre alquilenilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}(\text{CH}_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_4$ ,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  y  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ; cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2 y 3; q es 1 ó 2.

4. Agonista de TLR7 según las reivindicaciones 1 ó 2, seleccionado de entre las fórmulas (C) o (C'), en las que P<sup>3</sup> está seleccionado de entre alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$ ,  $\text{CF}_3$  y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{O}_s-$  e  $-\text{Y-L-X-P}(\text{O})(\text{OR}^X)(\text{OR}^Y)$ ; P<sup>4</sup> está seleccionado de entre -alquilarilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  e  $-\text{Y-L-X-P}(\text{O})(\text{OR}^X)(\text{OR}^Y)$ ; X<sup>C</sup> es N; X es un enlace covalente; L está seleccionado de entre alquilenilo  $\text{C}_1\text{-C}_6$  y  $-(\text{CH}_2)_p\text{O}(\text{CH}_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_4$ ,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$  y  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ; cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2 y 3; q está seleccionado de entre 1 y 2.

5. Agonista de TLR7 según las reivindicaciones 1 ó 2, seleccionado de entre las fórmulas (D) o (D'), en las que P<sup>5</sup>

está seleccionado de entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>).

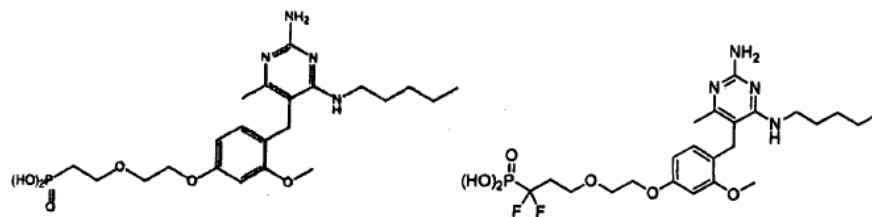
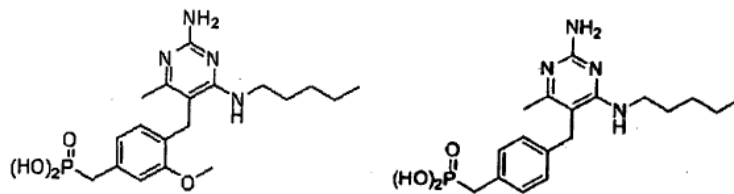
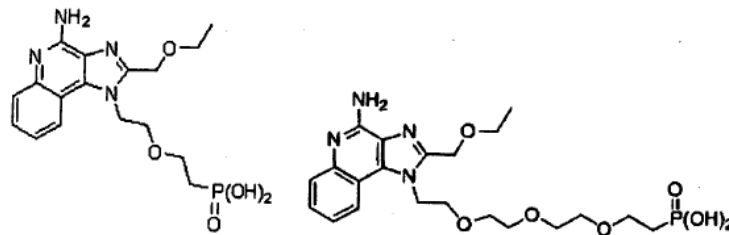
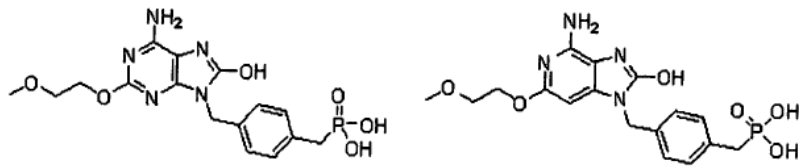
6. Agonista de TLR7 según las reivindicaciones 1 ó 2, seleccionado de entre las fórmulas (E) o (E'), en las que X<sup>E</sup> es CH<sub>2</sub>, P<sup>8</sup> es alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>).

7. Agonista de TLR7 según las reivindicaciones 1 ó 2, seleccionado de entre las fórmulas (E) o (E'), en las que P<sup>9</sup> es -NH alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido con OH y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>).

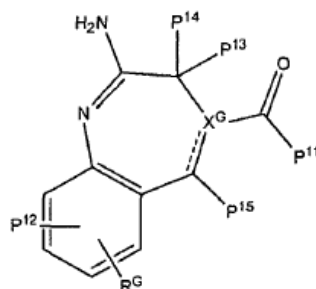
8. Agonista de TLR7 según las reivindicaciones 1 ó 2, seleccionado de entre las fórmulas (C) o (C'), que no es un compuesto en el que P<sup>4</sup> es -Y-L-X-P(O)(OR<sup>X</sup>)(OR<sup>Y</sup>).

9. Agonista de TLR7 según las reivindicaciones 1 ó 2, seleccionado de entre las fórmulas (C) o (C'), en las que P<sup>4</sup> está seleccionado de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

10. Uno de los siguientes compuestos:



11. Compuesto de fórmula (G)

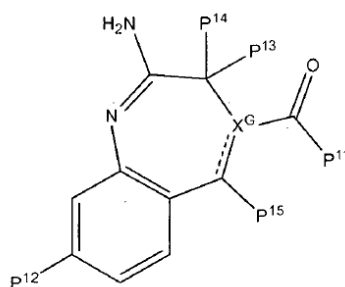


(G)

en la que:

$P^{11}$  está seleccionado de entre H, alquilo  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$ ,  $NR^V R^W$  e  $-Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y)$ ;  
 $P^{12}$  está seleccionado de entre H, alquilo  $C_1-C_6$ , arilo opcionalmente sustituido por  $-C(O)NR^V R^W$ , e  
 $-Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y)$ ;  
 $P^{13}$ ,  $P^{14}$  y  $P^{15}$  están seleccionados independientemente de entre H, alquilo  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$  e  
 $-Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y)$ ;  
 a condición de que al menos uno de entre  $P^{11}$ ,  $P^{12}$ ,  $P^{13}$ ,  $P^{14}$  o  $P^{15}$  sea  $-Y-L-X-P(O)(OR^X)(OR^Y)$ ;  
 $R^V$  y  $R^W$  están seleccionados independientemente de entre H, alquilo  $C_1-C_6$  o junto con el átomo de nitrógeno  
 al que están fijados forman un anillo heterocíclico de 4 a 7 miembros;  
 $X^G$  está seleccionado de entre C, CH y N;  
 ----- representa un doble enlace opcional, en el que  $X^G$  es C si ----- es un doble enlace; y  
 $R^G$  está seleccionado de entre H y alquilo  $C_1-C_6$ ;  
 X está seleccionado de entre un enlace covalente, O y NH;  
 Y está seleccionado de entre un enlace covalente, O, C(O), S y NH;  
 L está seleccionado de entre un enlace covalente alquilenilo  $C_1-C_6$ , alquenileno  $C_1-C_6$ , arileno, heteroarileno,  
 alquilenoxi  $C_1-C_6$  y  $-((CH_2)_p O)_q (CH_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes  
 seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo  $C_1-C_4$ ,  $-OP(O)(OH)_2$  y  $-P(O)(OH)_2$ ;  
 cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2, 3, 4, 5 y 6; y  
 q está seleccionado de entre 1, 2, 3 y 4.

12. Compuesto según la reivindicación 11, en el que el compuesto de fórmula (G) tiene una estructura según la fórmula (G') que se muestra a continuación:



(G')

en la que los sustituyentes  $P^{11}$ ,  $P^{12}$ ,  $P^{13}$ ,  $P^{14}$ ,  $P^{15}$  y  $X^G$  son como se definen en la reivindicación 11.

13. Agonista de TLR7 según las reivindicaciones 1 ó 2, o compuesto según las reivindicaciones 11 ó 12, en el que X es O; L está seleccionado de entre alquilenilo  $C_1-C_6$  y  $-((CH_2)_p O)_q (CH_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo  $C_1-C_4$ ,  $-OP(O)(OH)_2$  y  $-P(O)(OH)_2$ ; cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2 y 3; y q está seleccionado de entre 1 y 2.

14. Agonista de TLR7 según las reivindicaciones 1 ó 2, o compuesto según las reivindicaciones 11 ó 12, en el que X es un enlace covalente; L está seleccionado de entre alquilenilo  $C_1-C_6$  y  $-((CH_2)_p O)_q (CH_2)_p-$ , cada uno opcionalmente sustituido con 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente de entre halo, OH, alquilo  $C_1-C_4$ ,  $-OP(O)(OH)_2$  y  $-P(O)(OH)_2$ ; cada p está seleccionado independientemente de entre 1, 2 y 3; y q está seleccionado de entre 1 y 2.

15. Composición que comprende un agonista de TLR o compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y una sal metálica insoluble.

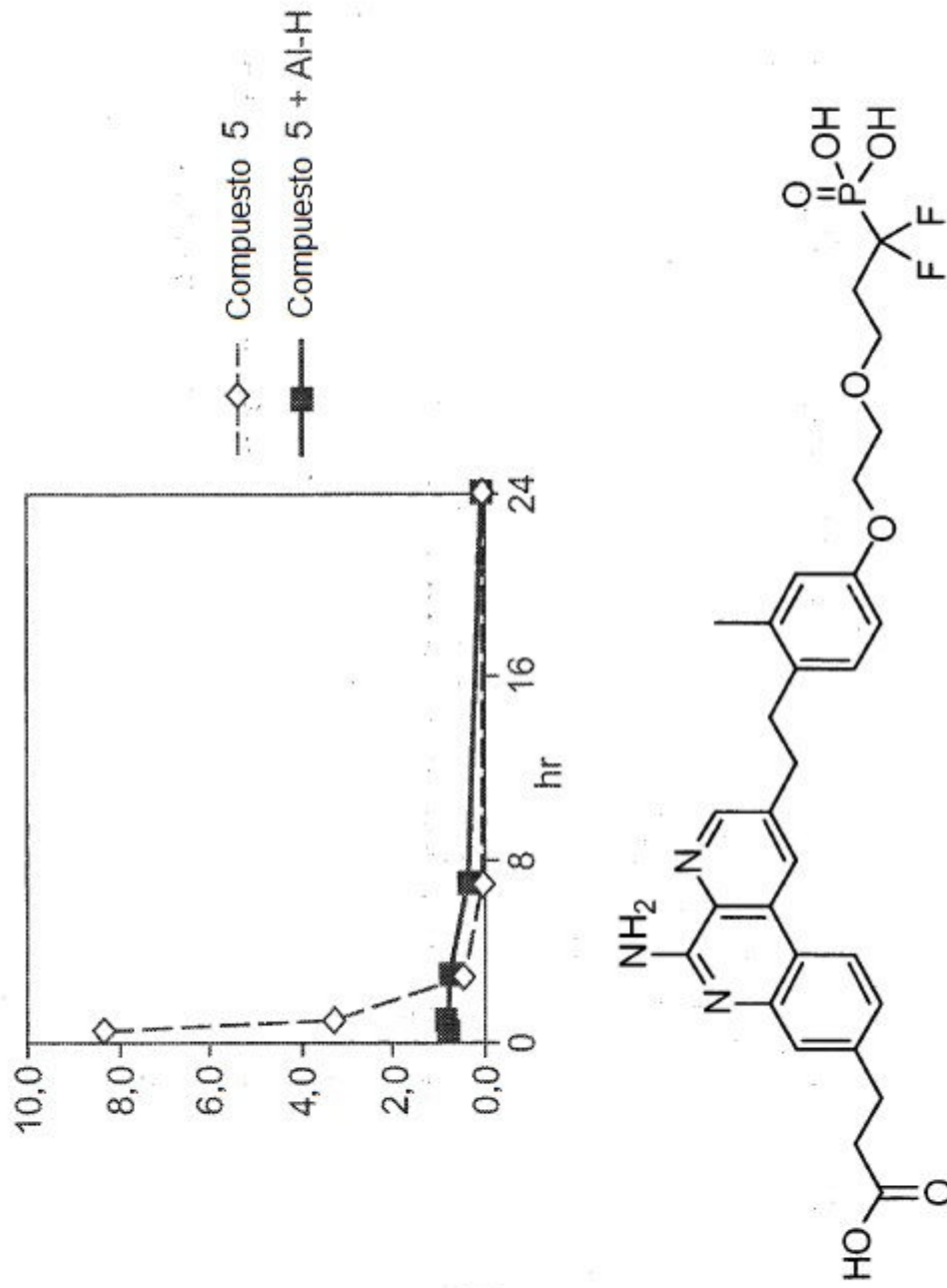


FIG. 1

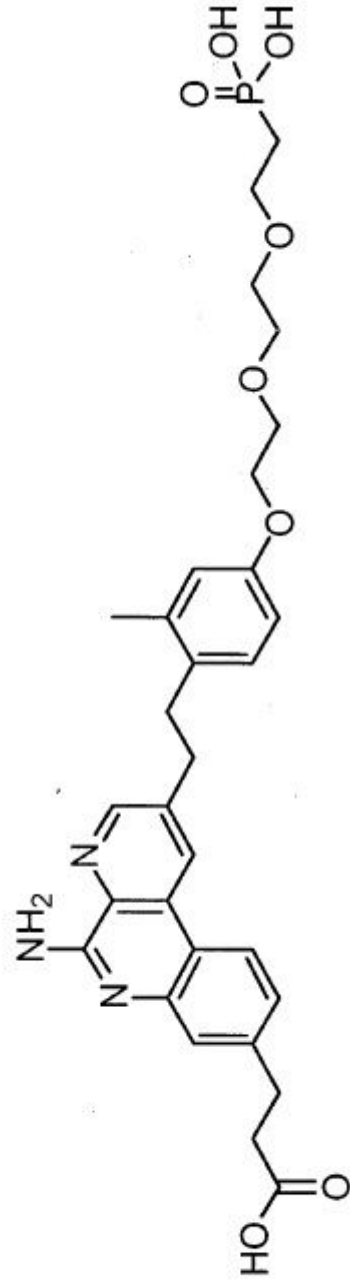
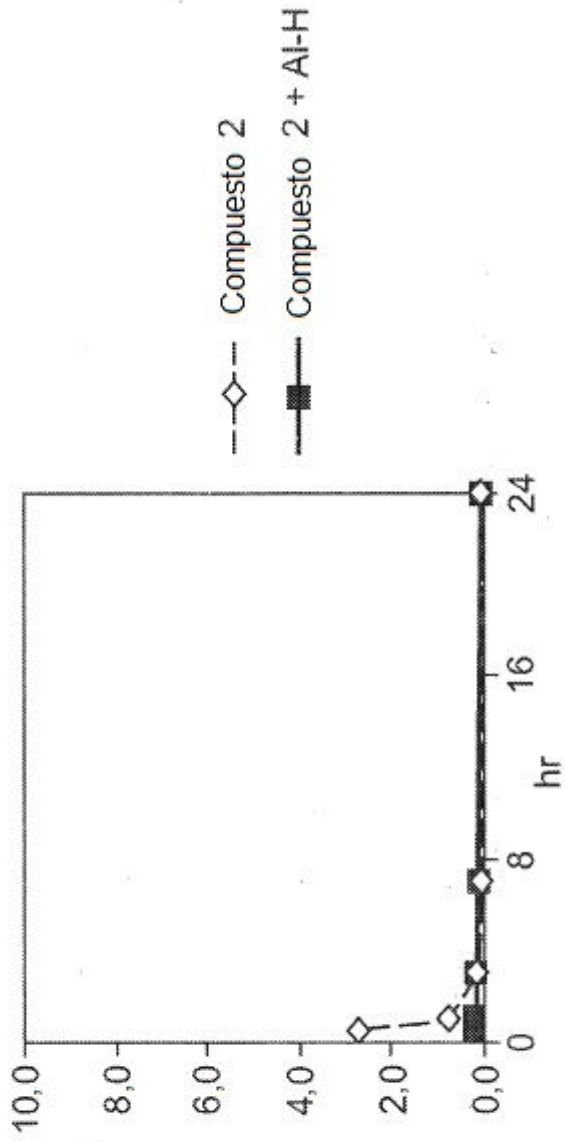
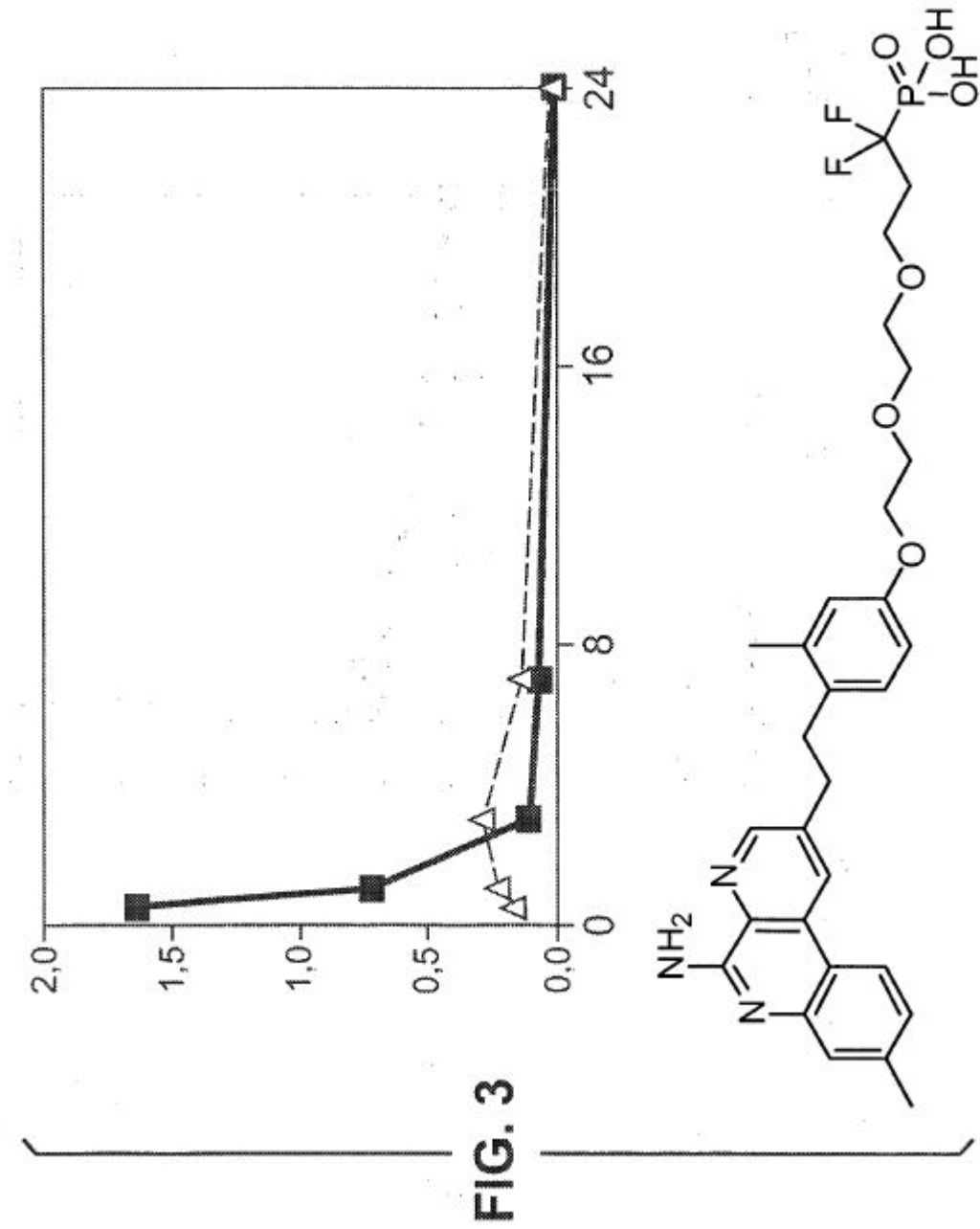


FIG. 2





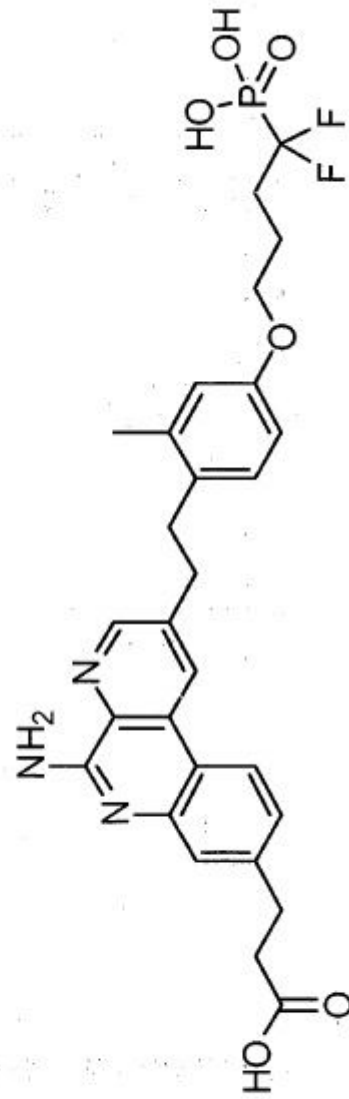
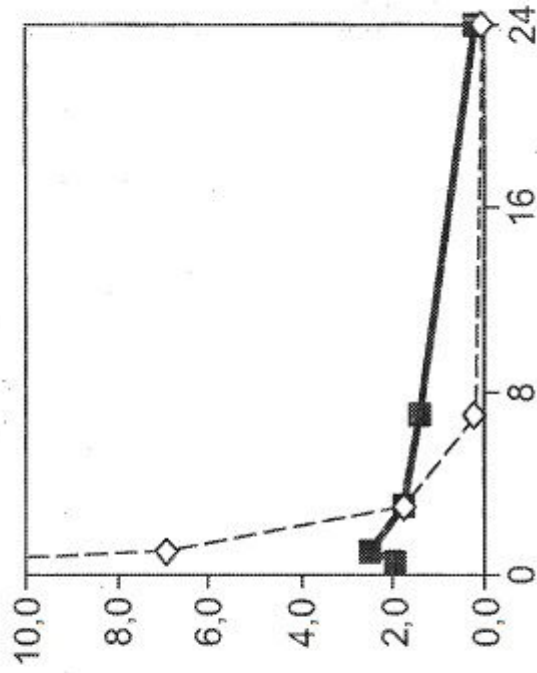
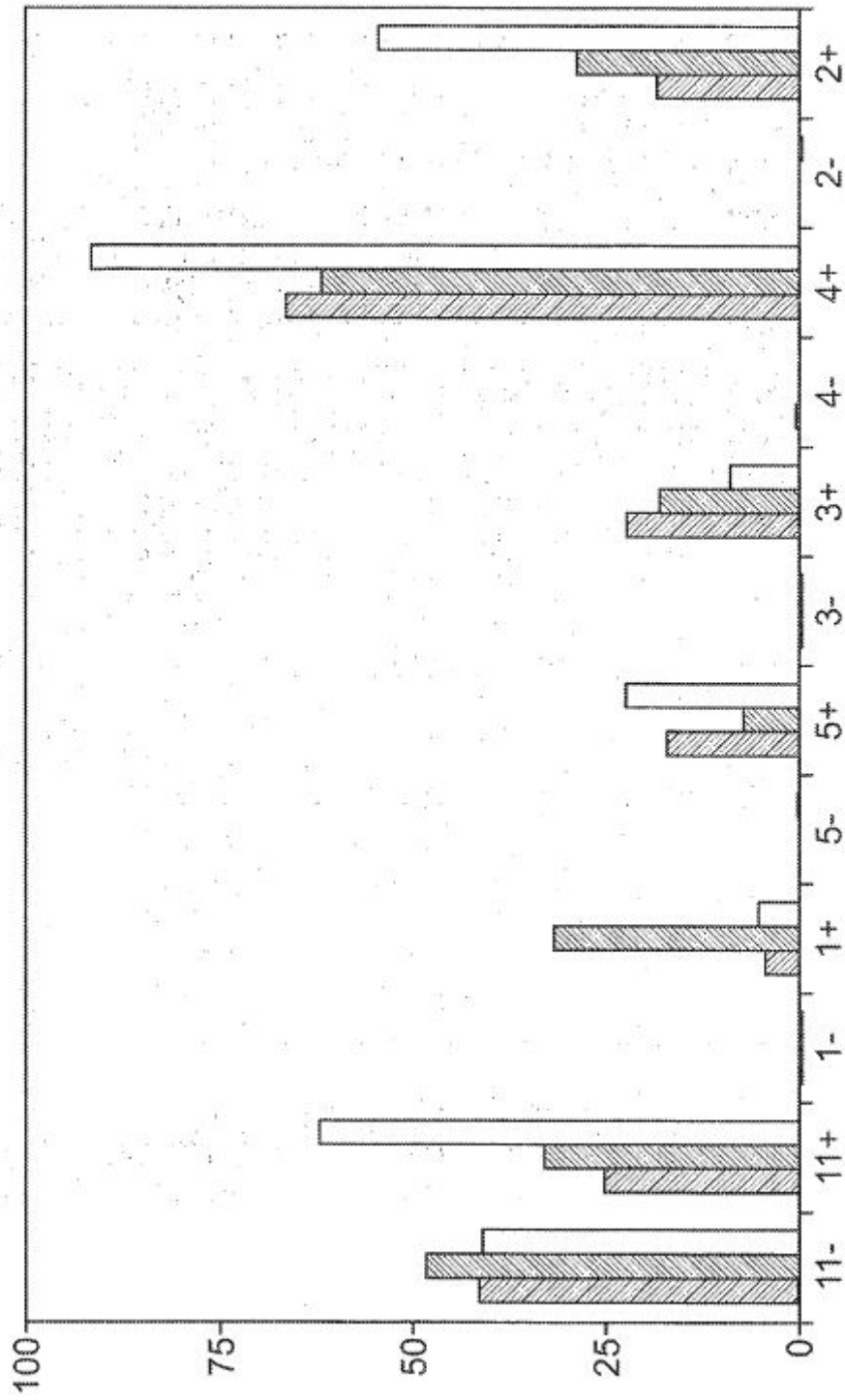


FIG. 4

FIG. 5



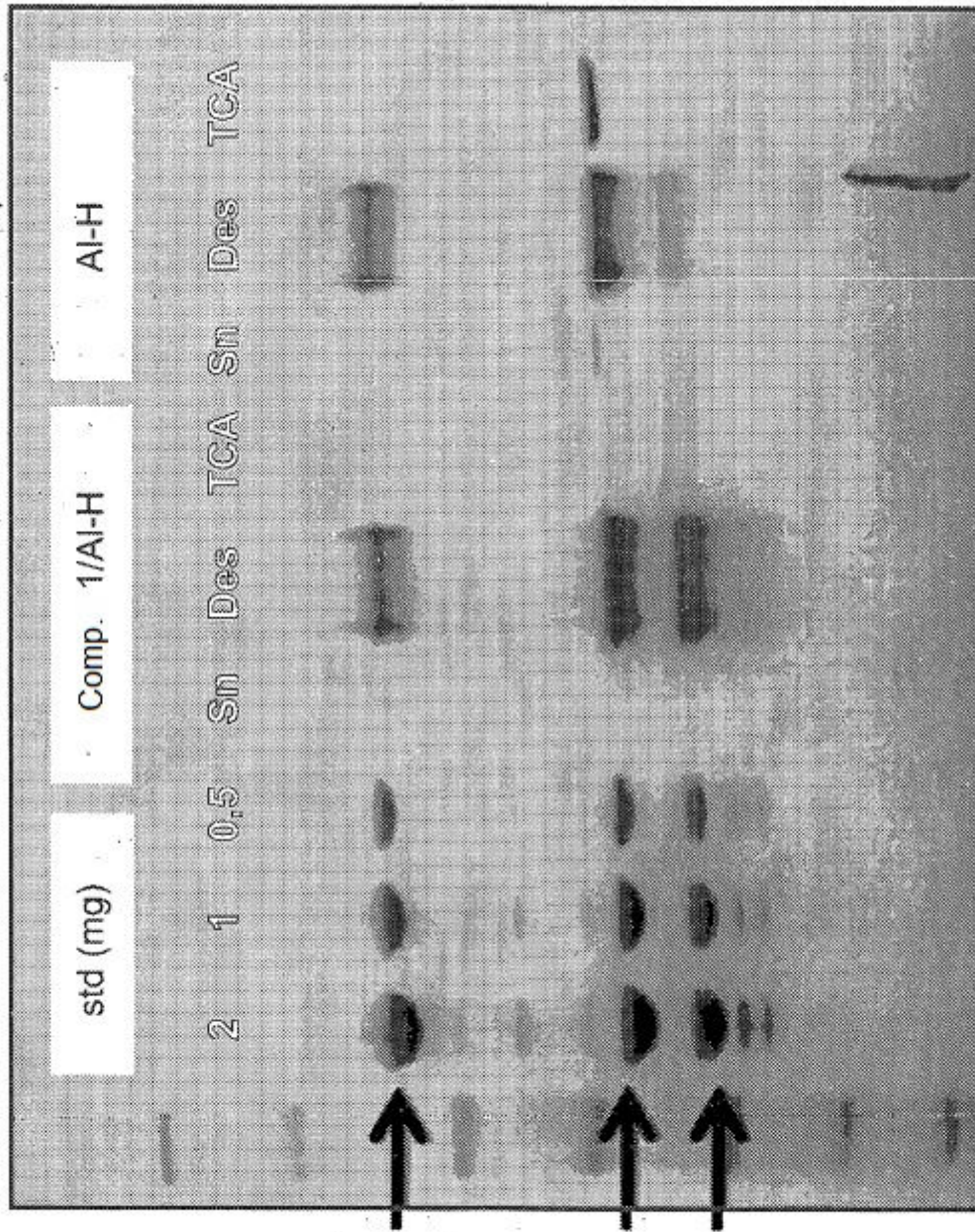
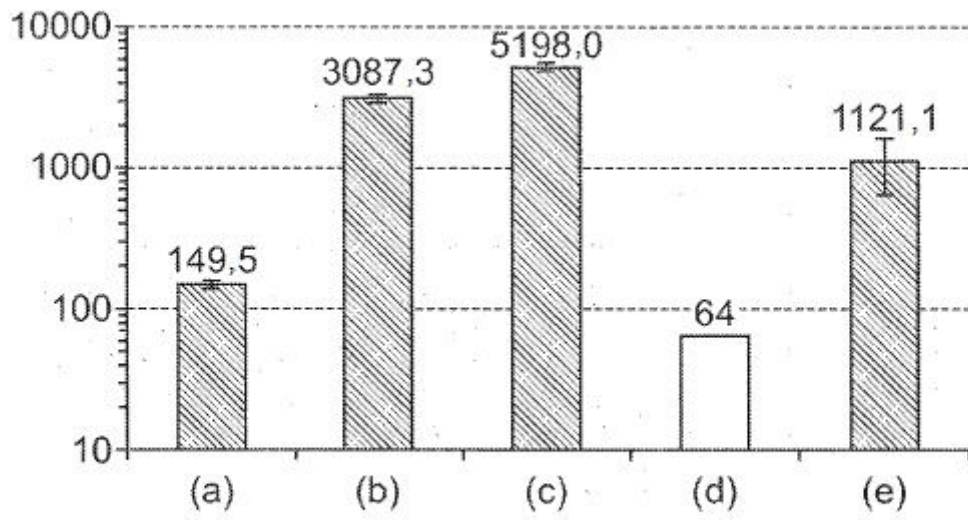
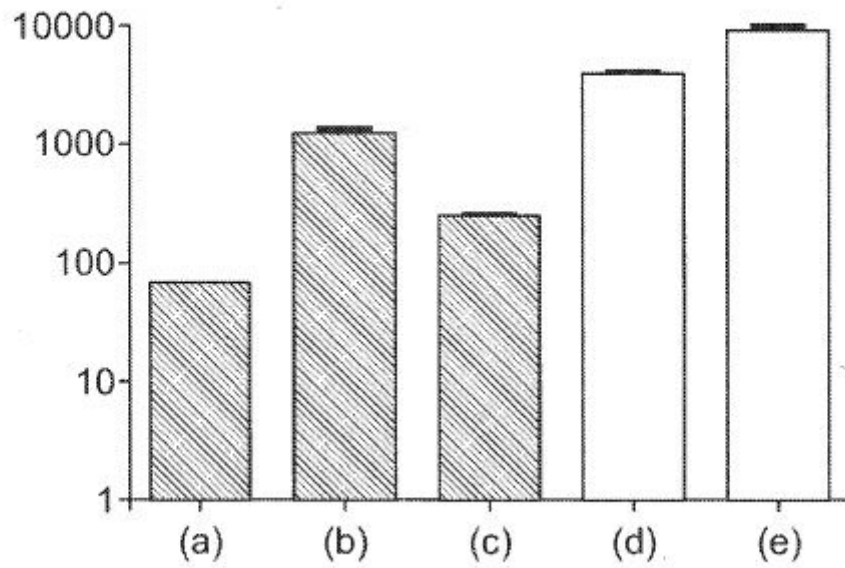


FIG. 6

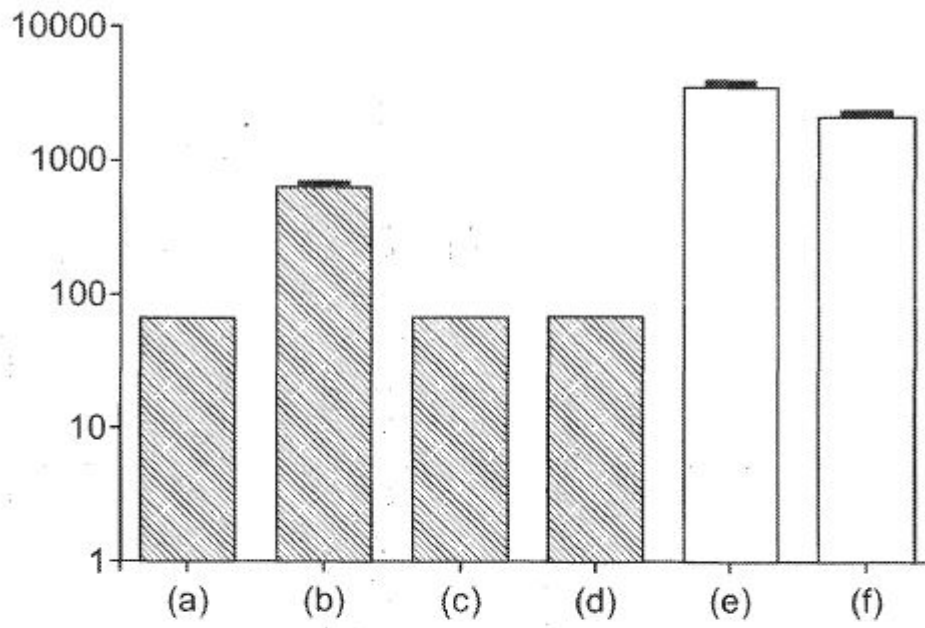
**FIG. 7**



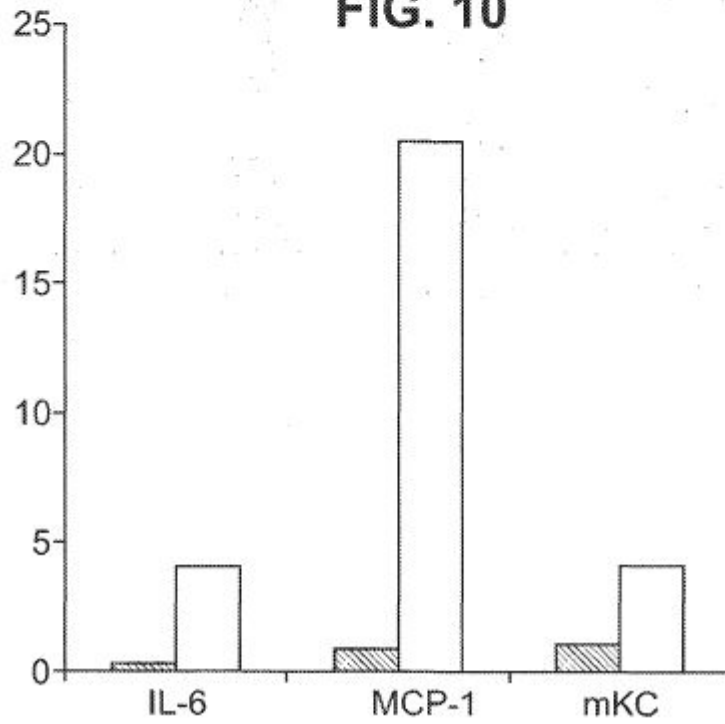
**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 11**

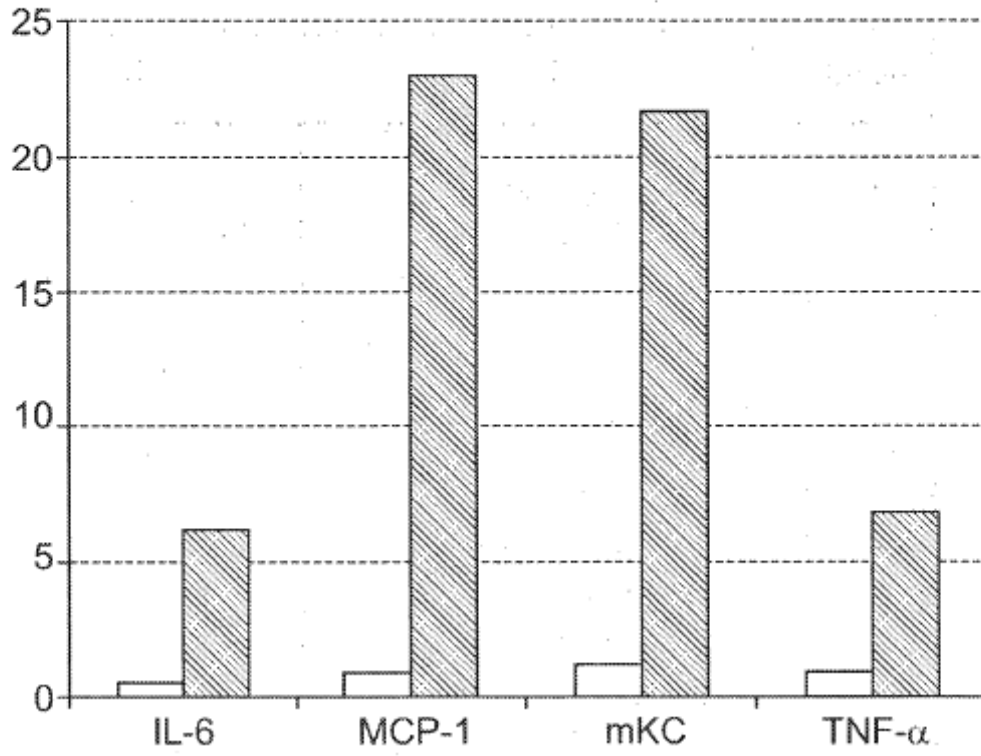
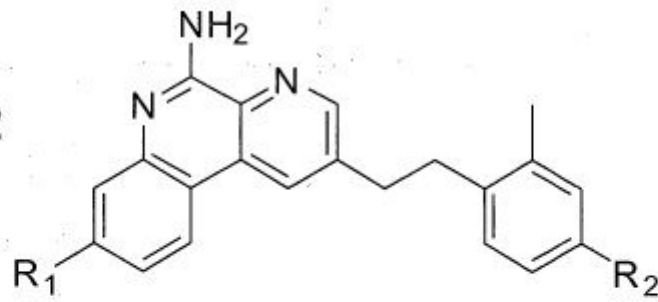


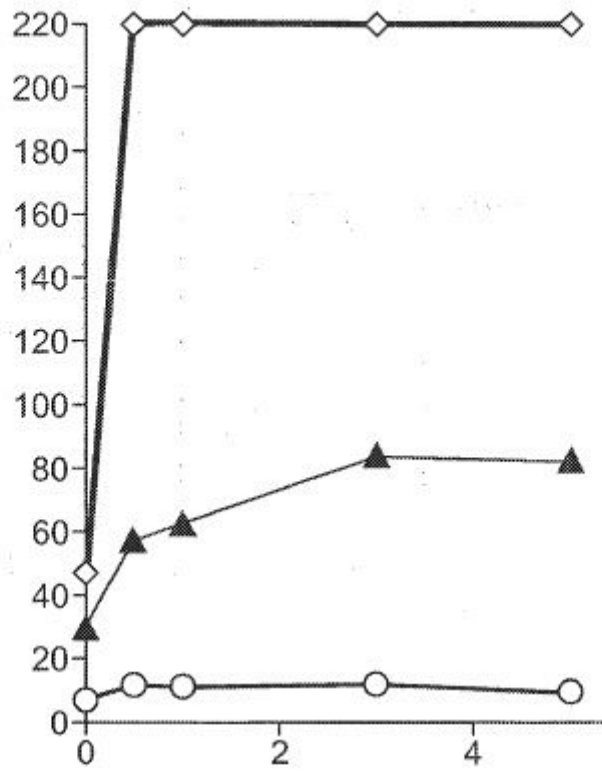
FIG. 12



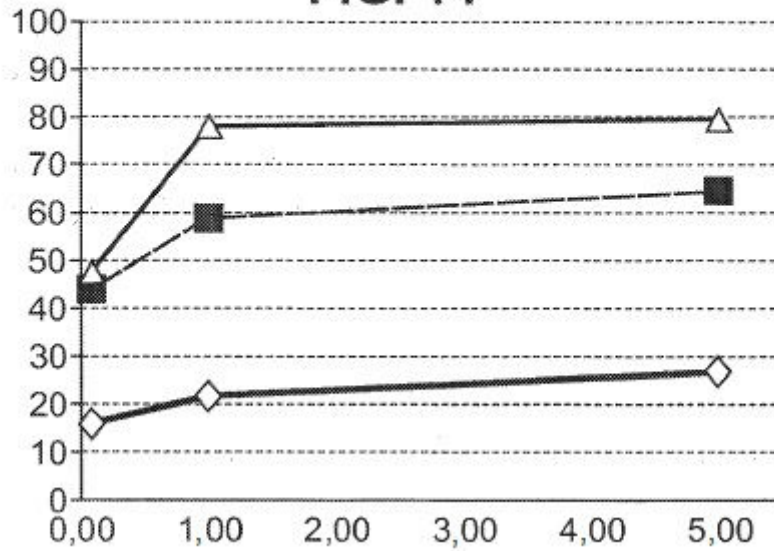
<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>	<u>Comp.</u>
Me		13
Me		1
		3
		4
		5
		2



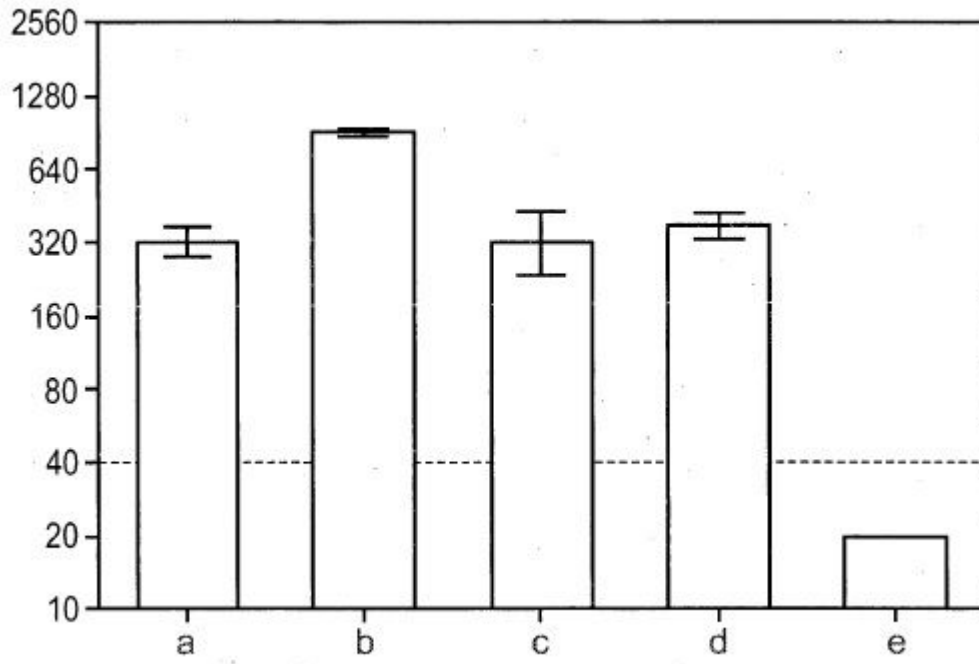
**FIG. 13**



**FIG. 14**



**FIG. 15**



**FIG. 16**

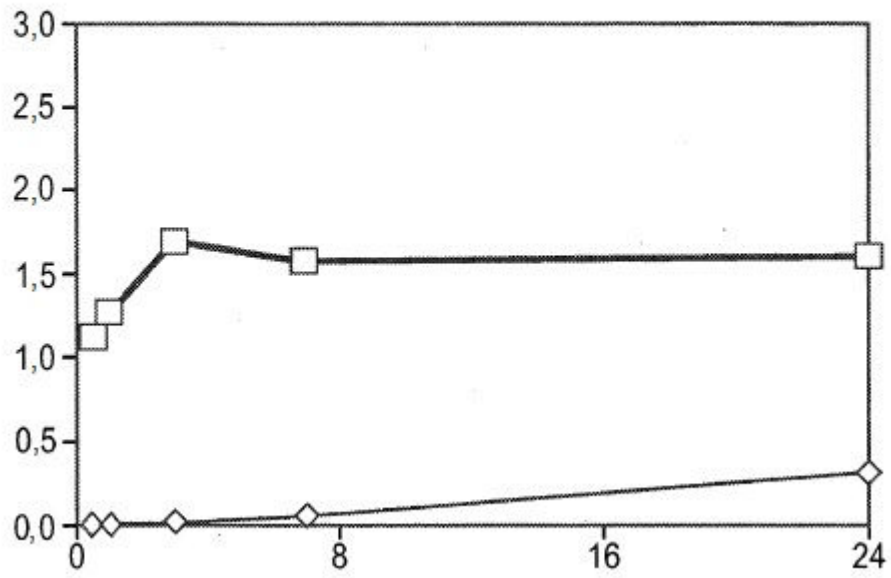


FIG. 17A

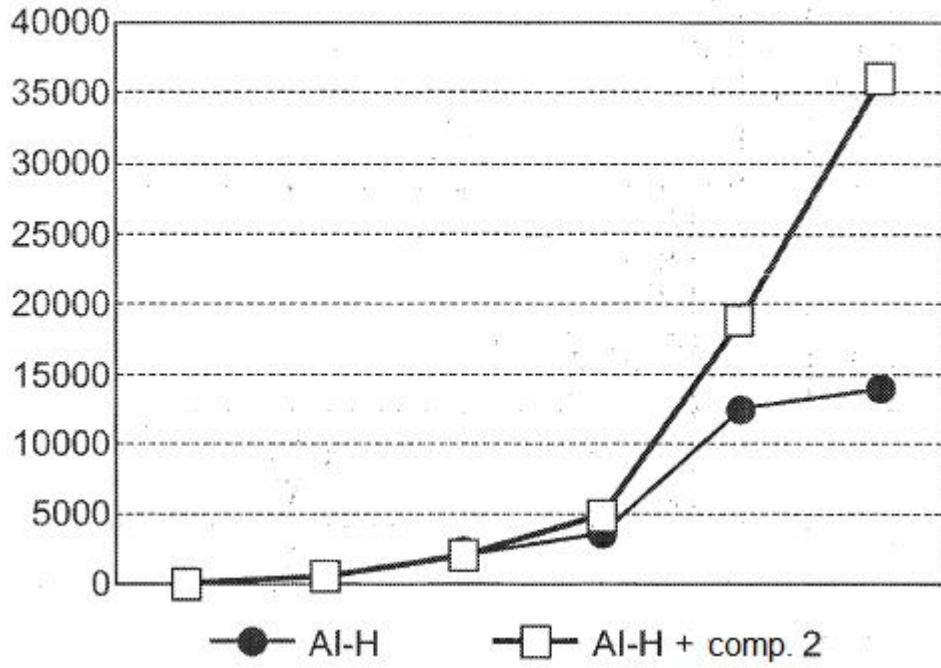


FIG. 17B

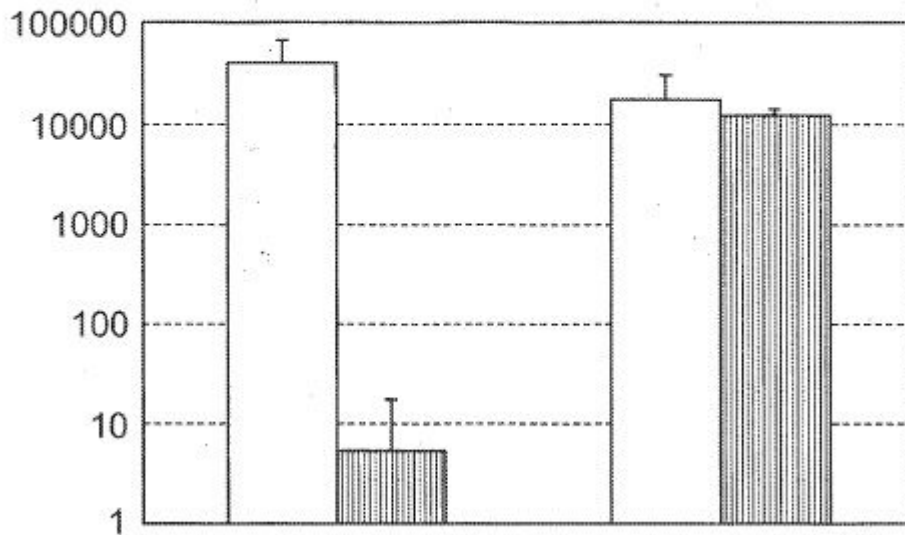


FIG. 18

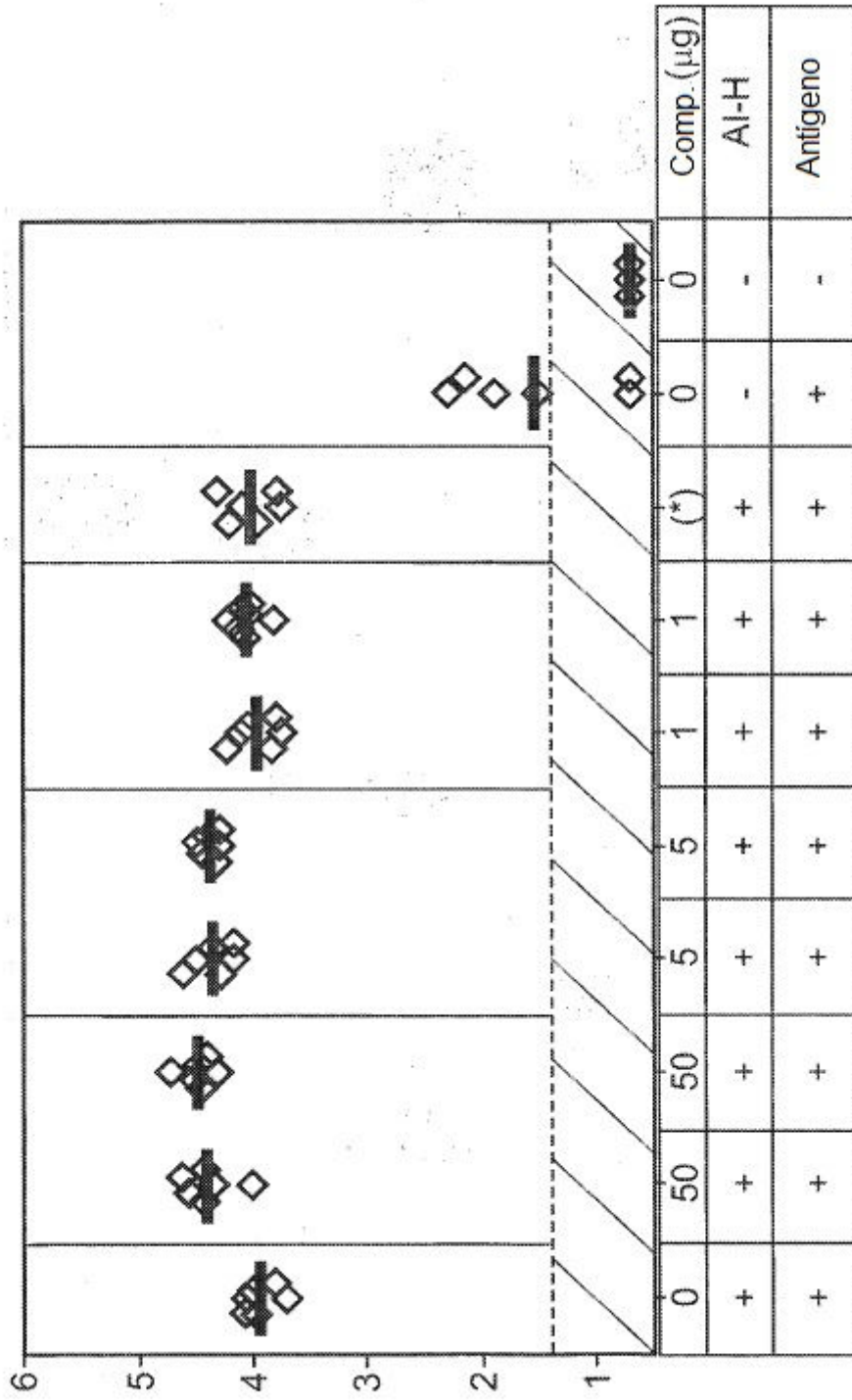


FIG. 19(A)

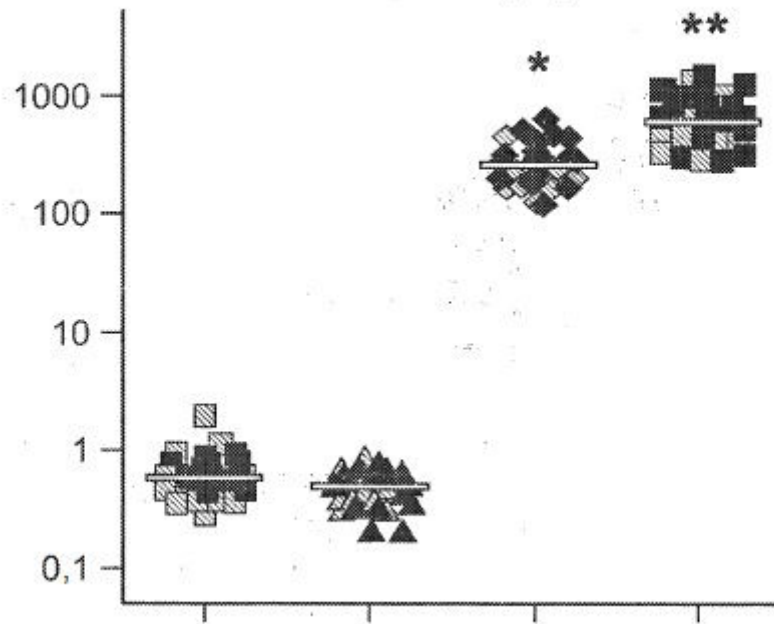
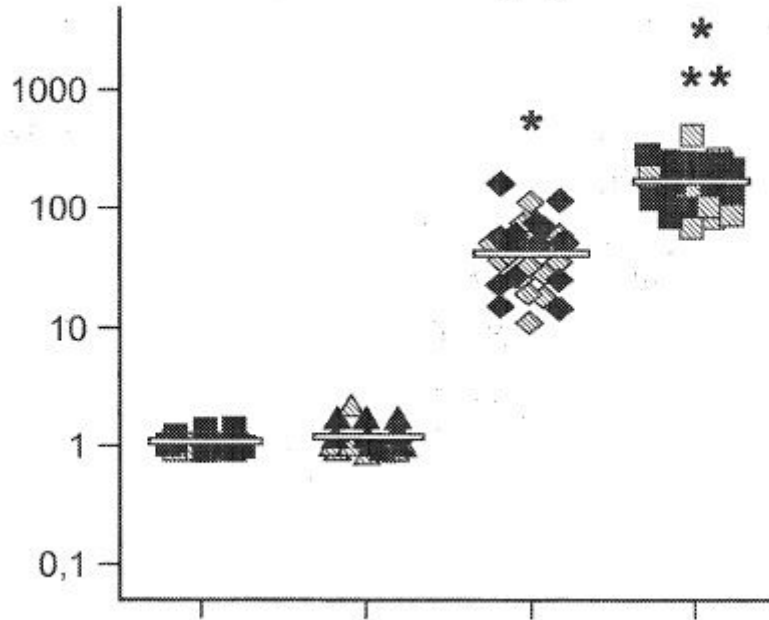
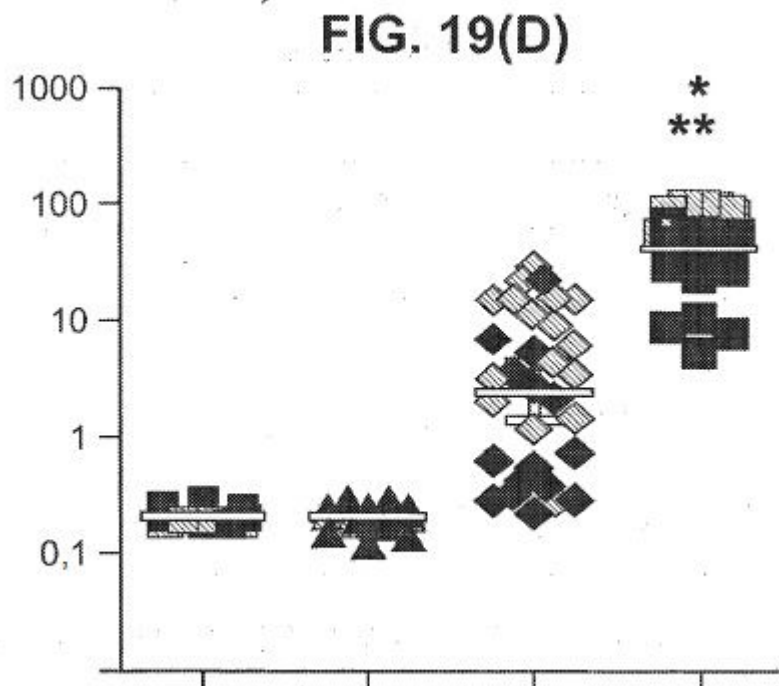
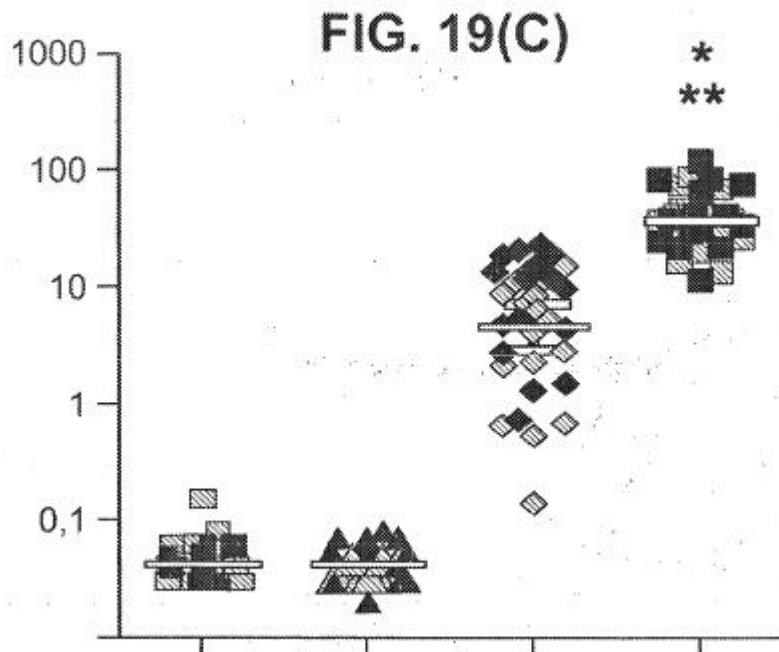
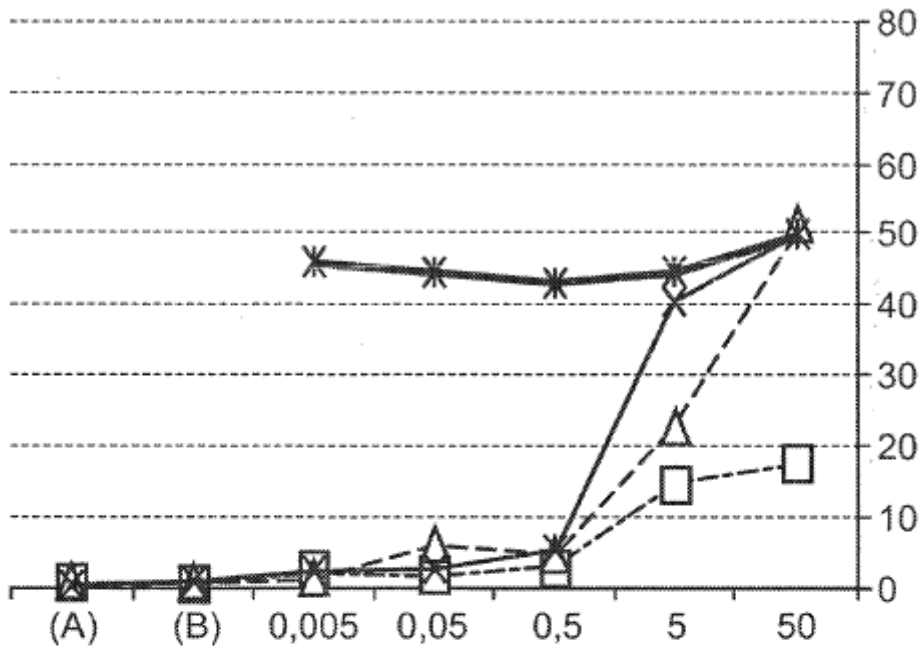


FIG. 19(B)

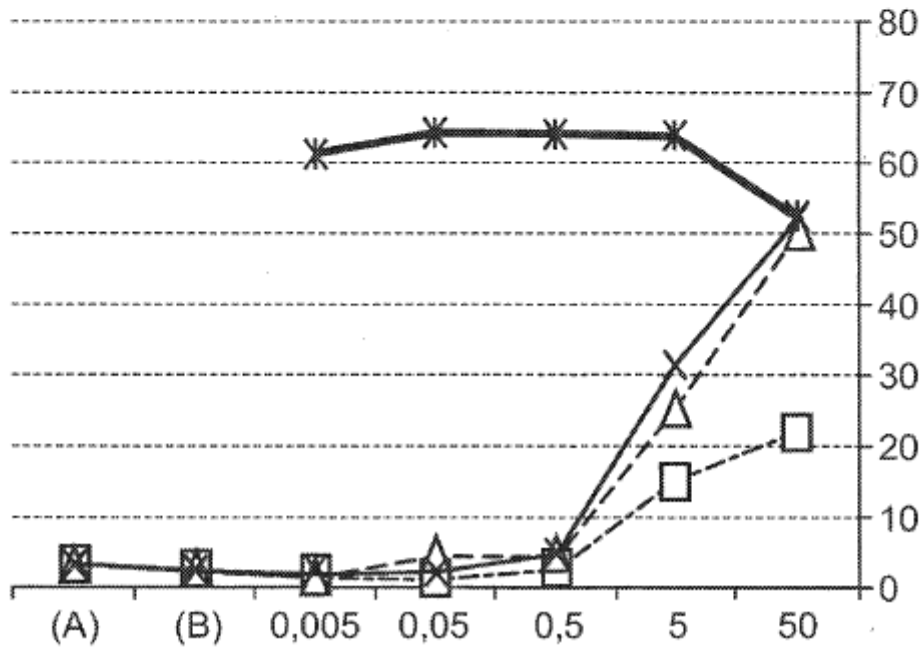


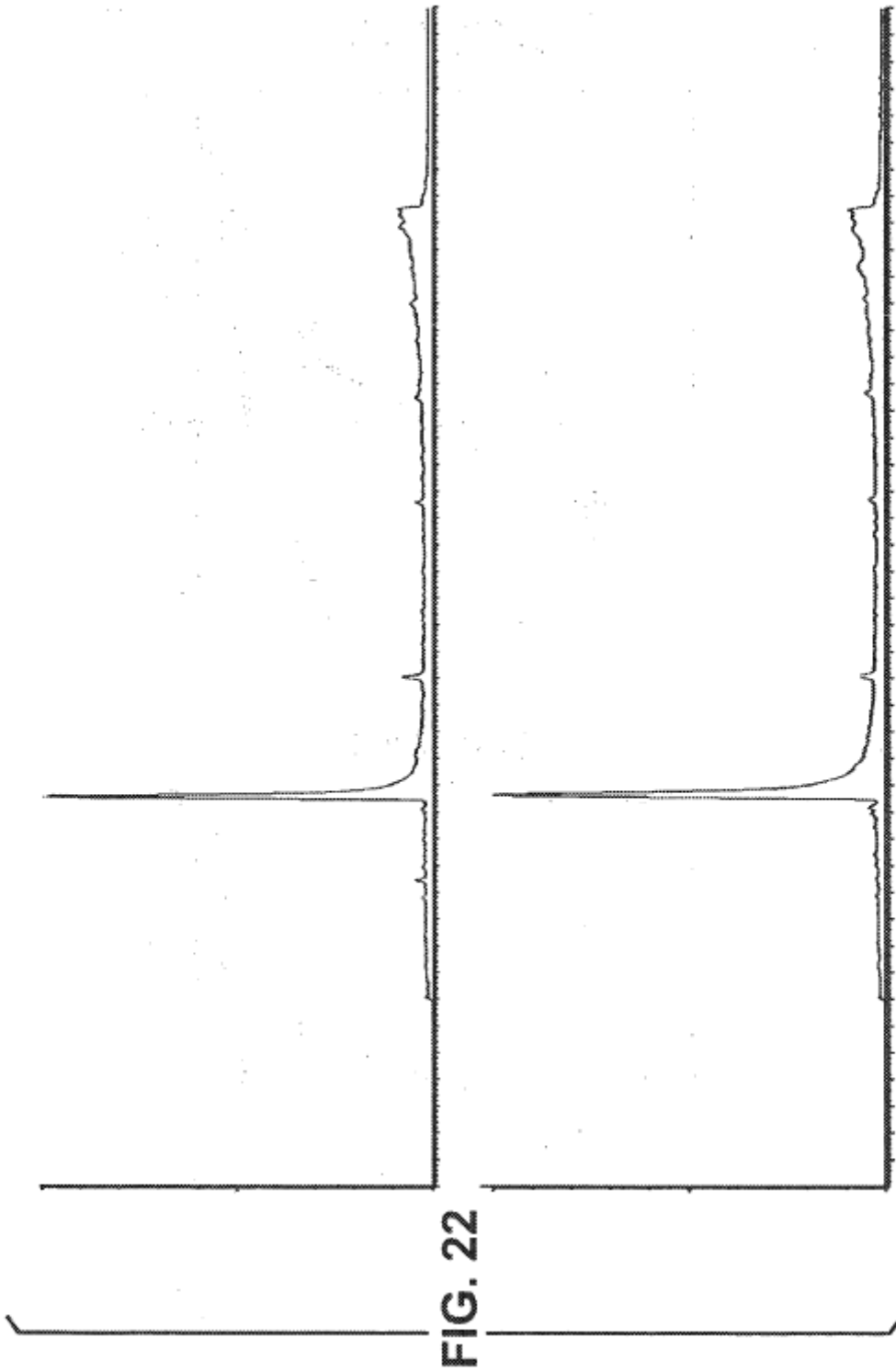


**FIG. 20**



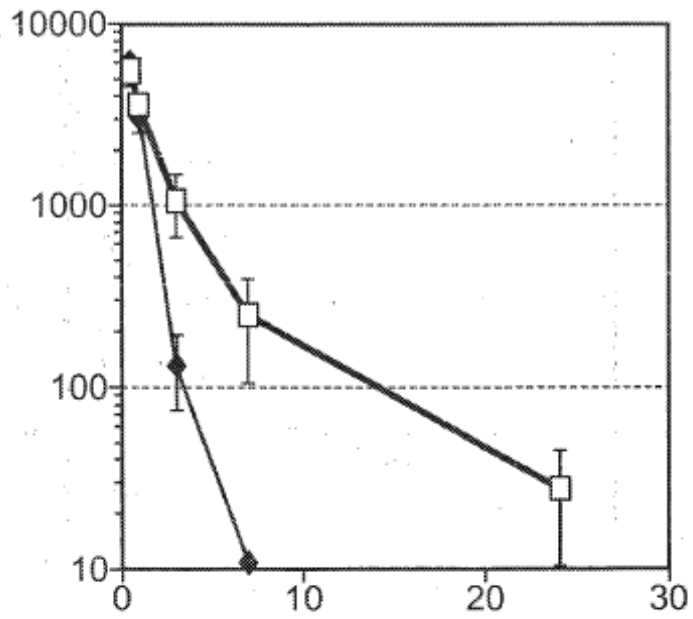
**FIG. 21**



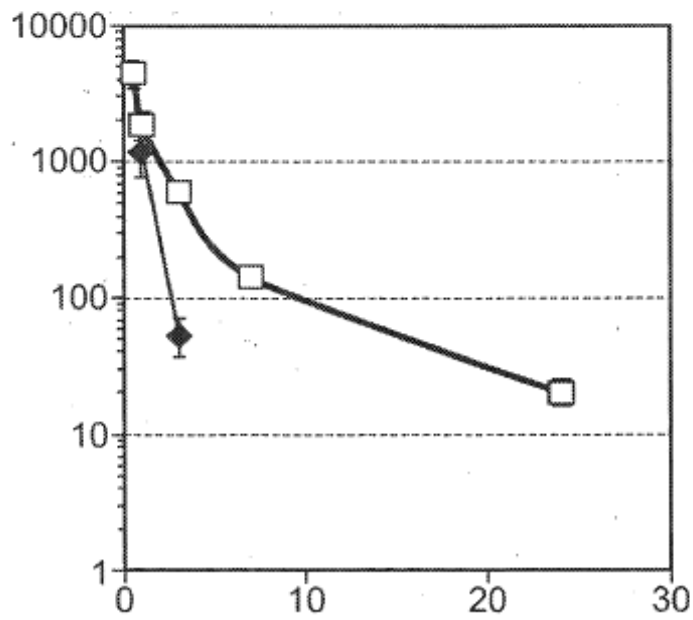




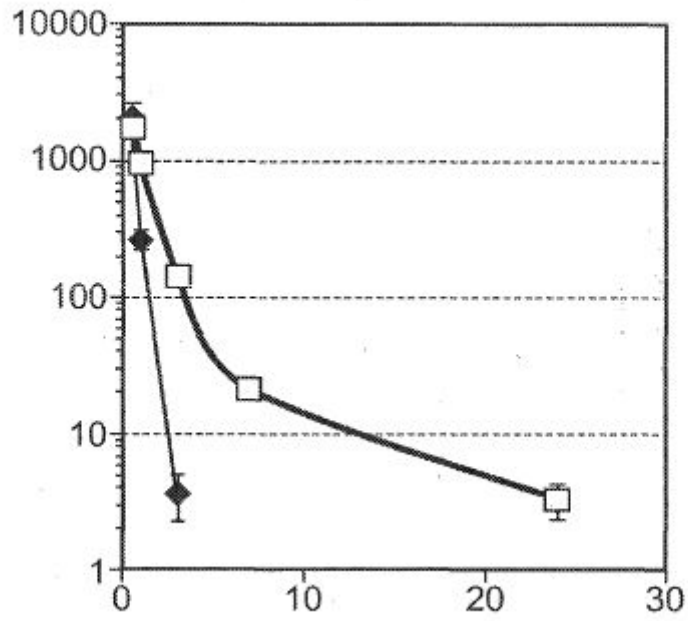
**FIG. 23A**



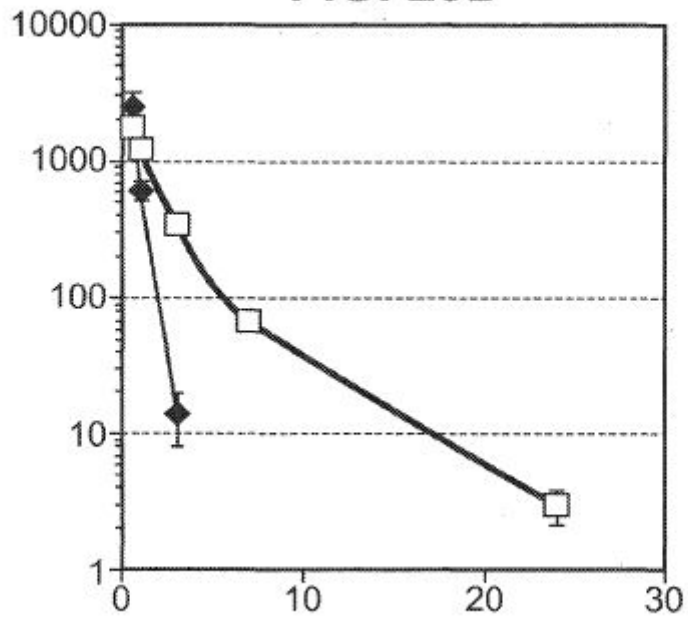
**FIG. 23B**



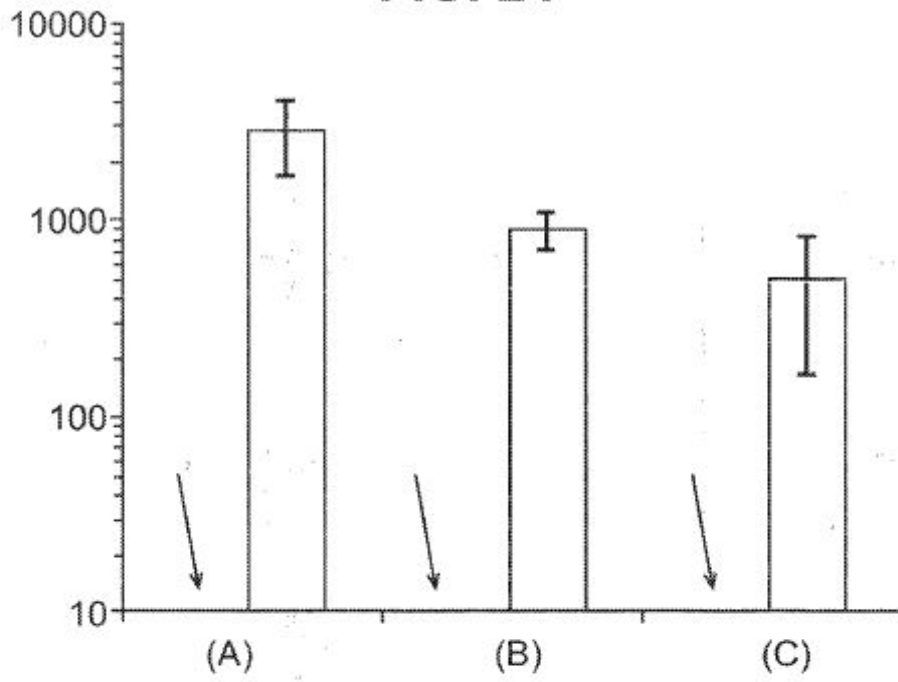
**FIG. 23C**



**FIG. 23D**



**FIG. 24**



**FIG. 25**

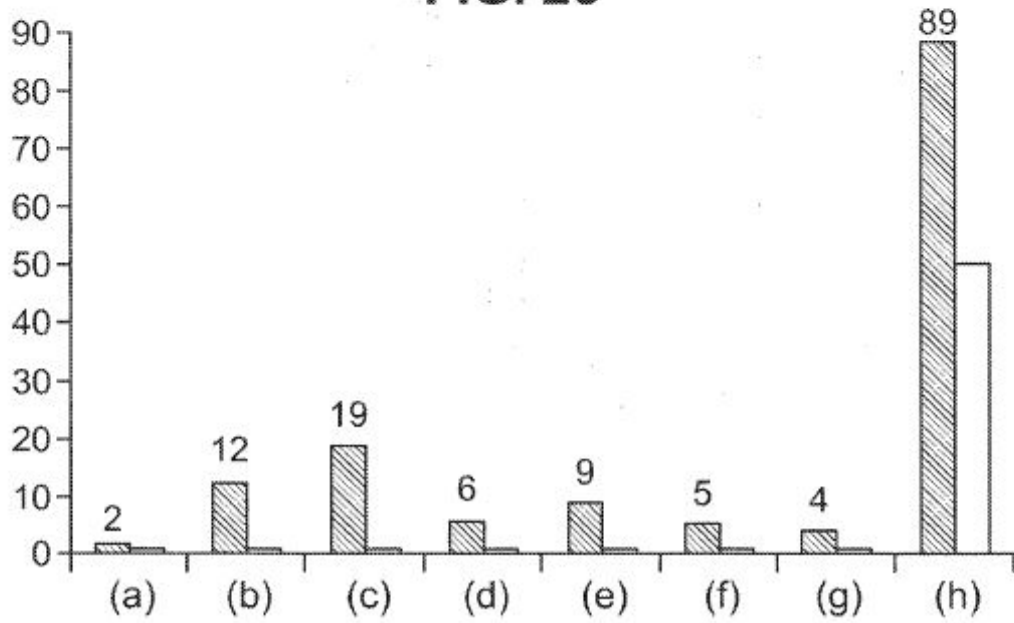


FIG. 26

