

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 950**

51 Int. Cl.:

**C07D 487/04** (2006.01)

**A61K 31/519** (2006.01)

**A61P 31/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2014 PCT/EP2014/063467**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14207082**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2014 E 14738751 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 3030563**

54 Título: **Derivados de pirrolo[3,2-d]pirimidina para el tratamiento de infecciones víricas y otras enfermedades**

30 Prioridad:

**27.06.2013 EP 13174108**

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

**11.12.2017**

73 Titular/es:

**JANSSEN SCIENCES IRELAND UC (100.0%)  
Eastgate Village, Eastgate  
Little Island, Co. Cork, IE**

72 Inventor/es:

**MC GOWAN, DAVID CRAIG;  
PIETERS, SERGE MARIA ALOYSIUS;  
LAST, STEFAAN JULIEN;  
EMBRECHTS, WERNER;  
JONCKERS, TIM HUGO MARIA y  
RABOISSON, PIERRE JEAN-MARIE BERNARD**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 645 950 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Derivados de pirrolo[3,2-d]pirimidina para el tratamiento de infecciones víricas y otras enfermedades

5 Esta invención se refiere a derivados de pirrolo[3,2-d]pirimidina, a procesos para su preparación, a composiciones farmacéuticas y a su uso en el tratamiento y/o la terapia de enfermedades.

10 La presente invención se refiere al uso de derivados de pirrolo[3,2-d]pirimidina, más específicamente al uso de derivados de pirrolo[3,2-d]pirimidina en el tratamiento de infecciones víricas, trastornos inmunitarios o inflamatorios, el cual implica la modulación o el agonismo de receptores de tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés). Los receptores de tipo Toll son proteínas transmembranales primarias que se caracterizan por un dominio extracelular rico en leucina y una extensión citoplásmica que contiene una región conservada. El sistema inmunitario innato puede reconocer patrones moleculares asociados con patógenos mediante estos TLR que se expresan en la superficie celular de ciertos tipos de células inmunitarias. El reconocimiento de patógenos externos activa la producción de citocinas y aumenta la cantidad de moléculas coestimuladoras en los fagocitos. Esto conlleva la modulación del comportamiento de los linfocitos T.

20 La mayoría de las especies de mamíferos tienen entre diez y quince tipos de receptores de tipo Toll. Se han identificado trece TLR (denominados simplemente TLR1-TLR13) en seres humanos y ratones conjuntamente, y se han encontrado formas equivalentes de muchos de ellos en otras especies de mamíferos. Sin embargo, los equivalentes de ciertos TLR que se encuentran en los seres humanos no están presentes en todos los mamíferos. Por ejemplo, un gen que codifica una proteína análoga a TLR10 en los seres humanos está presente en ratones, pero al parecer ha sido dañado en algún momento del pasado por un retrovirus. Por otro lado, los ratones expresan los TLR 11, 12 y 13, ninguno de los cuales está representado en los seres humanos. Otros mamíferos pueden expresar TLR que no se encuentren en los seres humanos. Otras especies que no sean mamíferos pueden tener TLR distintos a los de los mamíferos, como demuestra el TLR14, que se encuentra en el pez globo Takifugu. Esto puede complicar el proceso de utilización de animales de experimentación como modelos de inmunidad humana.

25 30 Para consultar artículos de revisión sobre los receptores de tipo Toll, remítase a los siguientes artículos de revistas: Hoffmann, J.A., *Nature*, 426, págs. 33-38, 2003; Akira, S., Takeda, K. y Kaisho, T., *Annual Rev. Immunology*, 21, págs. 335-376, 2003; Ulevitch, R. J., *Nature Reviews: Immunology*, 4, págs. 512-520, 2004.

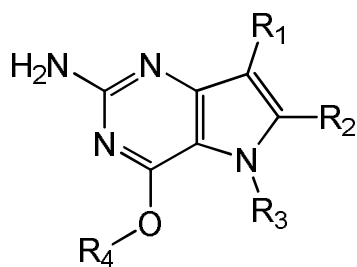
35 Previamente se han descrito compuestos que presentan actividad sobre los receptores de tipo Toll, tales como derivados heterocíclicos en el documento WO2000/006577, derivados de adenina en los documentos WO98/01448 y WO 99/28321, y pirimidinas en el documento WO2009/067081.

40 En el tratamiento de ciertas infecciones víricas, se pueden administrar inyecciones regulares de interferón (IFN-alfa), como en el caso del virus de la hepatitis C (VHC). Los inductores de IFN que son moléculas de bajo peso molecular los cuales se pueden administrar por vía oral ofrecen las ventajas potenciales de una inmunogenicidad reducida y comodidad de administración. Por lo tanto, los inductores de IFN novedosos son una nueva clase de fármacos potencialmente eficaces para el tratamiento de infecciones víricas. Para consultar un ejemplo en la bibliografía de un inductor de IFN que es una molécula de bajo peso molecular con un efecto antivírico, remítase a De Clercq, E.; Descamps, J.; De Somer, P. *Science* 1978, 200, 563-565.

45 El interferón  $\alpha$  también se administra a los pacientes combinado con otros fármacos en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. Los agonistas de TLR 7/8 también despiertan interés como adyuvantes de vacunas debido a su capacidad para inducir una respuesta pronunciada de Th1.

50 Sin embargo, se necesitan con urgencia moduladores de receptores de tipo Toll novedosos que presenten una selectividad preferida y un perfil de seguridad mejorado en comparación con los compuestos de la técnica anterior.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I)



55 (I)

y una de sus sales, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables, donde

R<sub>1</sub> es H, flúor o metilo;

R<sub>2</sub> es H, halógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>;

5 R<sub>3</sub> es alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre ariloxi, heterociclo, halógeno, arilo, alquilamino, dialquilamino, alquilo C<sub>1-6</sub>, ácido carboxílico, éster carboxílico, amida carboxílica, nitrilo o alcoxi C<sub>1-6</sub>;

o donde

10 R<sub>3</sub> es un alquilarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, ariloxi, arilo, alquilamino, dialquilamino, alquilo C<sub>1-6</sub>, ácido carboxílico, éster carboxílico, amida carboxílica, sulfonamida, nitrilo o alcoxi C<sub>1-6</sub>;

15 R<sub>4</sub> es alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo, alquilo C<sub>1-6</sub>, cicloalquilo C<sub>3-7</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> o arilo opcionalmente sustituido además con alquilo C<sub>1-6</sub>, y cicloalquilo C<sub>3-7</sub> opcionalmente sustituido además con alquilo C<sub>1-6</sub>;

o donde

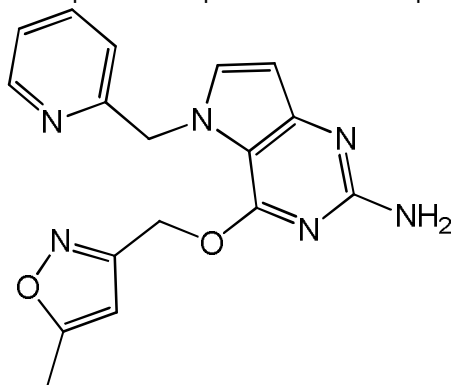
20 R<sub>4</sub> es un alquilarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, ariloxi, arilo, alquilamino, dialquilamino, alquilo C<sub>1-6</sub>, ácido carboxílico, éster carboxílico, amida carboxílica, sulfonamida, nitrilo o alcoxi C<sub>1-6</sub>.

25 Los compuestos preferidos son aquellos de fórmula (I) donde R<sub>3</sub> es un grupo CH<sub>2</sub>-arilo (sustituido o no sustituido), y R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> se describen como se ha indicado anteriormente.

30 En una segunda realización, se encuentran los compuestos de fórmula (I) donde R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son ambos grupos CH<sub>2</sub>-arilo opcionalmente sustituidos además como se ha descrito anteriormente, y R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son como se han descrito anteriormente.

Otras realizaciones preferidas son aquellas de fórmula (I) donde R<sub>1</sub> es flúor, R<sub>2</sub> es hidrógeno, y R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se describen como se ha indicado anteriormente.

35 El compuesto más preferido es un compuesto de fórmula (II) que tiene la siguiente estructura química:



(II)

40 Los compuestos de fórmula (I) y (II), y sus sales, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables presentan actividad como agentes farmacéuticos, en particular como moduladores de la actividad de los receptores de tipo Toll (especialmente TLR7).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o (II), o una de sus sales, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables, junto con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

45 Además, un compuesto de fórmula (I) o (II), o una de sus sales, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la presente invención, o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto de fórmula (I) o (II), o una de sus sales, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables se pueden utilizar como medicamento.

50 Otro aspecto de la invención consiste en que un compuesto de fórmula (I) o (II), o una de sus sales, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables, o dicha composición farmacéutica que comprende dicho compuesto de

fórmula (I) o (II) o una de sus sales, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables se pueden utilizar según corresponda en el tratamiento de cualquier trastorno, el cual implique la modulación de TLR7.

5 El término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo alifático saturado de cadena lineal o de cadena ramificada que contiene el número especificado de átomos de carbono.

El término "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

10 El término "alquilarilo" se refiere a un hidrocarburo alifático saturado de cadena lineal o de cadena ramificada que contiene el número especificado de átomos de carbono sustituido con un arilo, donde el "arilo" se define como se indica más adelante.

15 El término "alquenilo" se refiere a un alquilo según se ha definido anteriormente constituido por al menos dos átomos de carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono.

El término "cicloalquilo" se refiere a un anillo carbocíclico que contiene el número especificado de átomos de carbono.

20 El término "alcoxi" se refiere a un grupo alquilo (cadena de carbono e hidrógeno) unido mediante un enlace sencillo a oxígeno como, por ejemplo, un grupo metoxi o un grupo etoxi.

25 El término "arilo" se refiere a una estructura anular aromática que comprende opcionalmente uno o dos heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en particular entre N y O. Dicha estructura anular aromática puede tener 5, 6 o 7 átomos anulares. En particular, dicha estructura anular aromática puede tener 5 o 6 átomos anulares.

El término "ariloxi" se refiere a una estructura anular aromática. Dicho grupo aromático está unido mediante un enlace sencillo a oxígeno.

30 El término "heterociclo" se refiere a moléculas que están saturadas o parcialmente saturadas e incluye tetrahidrofurano, dioxano u otros éteres cíclicos. Los heterociclos que contienen nitrógeno incluyen, por ejemplo, azetidina, morfolina, piperidina, piperazina, pirrolidina y similares. Otros heterociclos incluyen, por ejemplo, tiomorfolina, dioxolinilo y sulfonas cíclicas.

35 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) y (II) incluyen sus sales de adición de ácido y de base. Las sales de adición de ácido adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales atóxicas. Las sales de adición de base adecuadas se forman a partir de bases que forman sales atóxicas.

40 Los compuestos de la invención también pueden existir en formas solvatadas y no solvatadas. El término "solvato" se utiliza en la presente para describir un complejo molecular que comprende el compuesto de la invención y una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, etanol.

El término "polimorfo" se refiere a la capacidad del compuesto de la invención de existir en más de una forma o estructura cristalina.

45 Los compuestos de la presente invención se pueden administrar como productos amorfos o cristalinos. Se pueden obtener, por ejemplo, como masas compactas sólidas, polvos o películas mediante métodos tales como la precipitación, cristalización, liofilización, secado por pulverización o secado por evaporación. Se pueden administrar solos o combinados con uno o más compuestos de la invención diferentes o combinados con uno o más fármacos diferentes. En general, se administrarán como una formulación asociados con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El término "excipiente" se utiliza en la presente para describir cualquier ingrediente que no sea el o los compuestos de la invención. La selección del excipiente depende en gran medida de factores tales como la vía particular de administración, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y estabilidad, y la naturaleza de la forma farmacéutica.

50

55 Los compuestos de la presente invención o cualquier subgrupo de estos se pueden formular en varias formas farmacéuticas con el fin de poderlos administrar. Como composiciones adecuadas, se pueden citar todas las composiciones empleadas normalmente para administrar fármacos por vía sistémica. Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, se combina una cantidad eficaz del compuesto particular, opcionalmente en forma de sal de adición, como el principio activo, mezclándolo de forma íntima con un portador farmacéuticamente aceptable, pudiendo adoptar dicho portador una gran variedad de formas dependiendo de la forma del preparado que se desee para la administración. Estas composiciones farmacéuticas se encuentran convenientemente en una forma farmacéutica unitaria adecuada, por ejemplo, para la administración oral, rectal o percutánea. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones en una forma farmacéutica oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparados líquidos orales tales como suspensiones, jarabes, elixires, emulsiones y soluciones; o portadores sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, diluyentes, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de polvos, pastillas, cápsulas y comprimidos. Debido a su fácil

60

65

administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas farmacéuticas unitarias orales más convenientes, en cuyo caso se emplean obviamente portadores farmacéuticos sólidos. También se incluyen los preparados en forma sólida que se pueden convertir, poco antes de su uso, en formas líquidas. En las composiciones adecuadas para la administración percutánea, el portador comprende opcionalmente un agente potenciador de la penetración y/o un agente humectante adecuado, combinados opcionalmente con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones minoritarias, donde los aditivos no provocan ningún efecto perjudicial significativo en la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y/o puede que sean útiles para preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones se pueden administrar de varias formas, p. ej., como un parche transdérmico, como una unción dorsal puntual, como una pomada. Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar por inhalación o insuflación mediante métodos y formulaciones empleados en la técnica para la administración por esta vía. De este modo, en general los compuestos de la presente invención se pueden administrar a los pulmones en forma de una solución, una suspensión o un polvo seco.

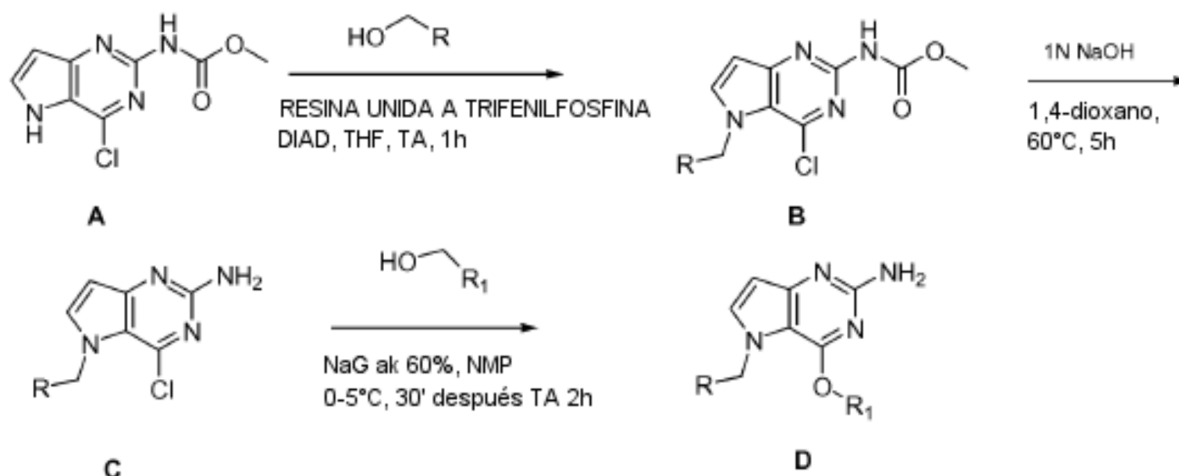
Es especialmente conveniente formular las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente en formas farmacéuticas unitarias debido a la uniformidad de la dosis y a que se pueden administrar fácilmente. La expresión "forma farmacéutica unitaria", tal como se utiliza en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias, donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociada con el portador farmacéutico requerido. Algunos ejemplos de las formas farmacéuticas unitarias de este tipo son los comprimidos (que incluyen los comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, pastillas, sobres de polvos, obleas, supositorios, suspensiones o soluciones inyectables y similares, y múltiples segregados de estos.

Los expertos en el tratamiento de enfermedades infecciosas serán capaces de determinar la cantidad eficaz a partir de los resultados de las pruebas que se presentan posteriormente en la presente. En general, se considera que una cantidad diaria eficaz sería de 0.01 mg/kg a 50 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de 0.1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. Podría resultar adecuado administrar la dosis requerida como dos, tres, cuatro o más subdosis en intervalos adecuados a lo largo del día. Dichas subdosis se pueden formular como formas farmacéuticas unitarias, por ejemplo, que contengan de 1 a 1000 mg y, en particular, de 5 a 200 mg de principio activo por forma farmacéutica unitaria.

La dosis exacta y la frecuencia de administración dependen del compuesto particular de fórmula (I) utilizado, la afección particular que se esté tratando, la gravedad de la afección que se esté tratando, la edad, el peso y el estado físico general del paciente particular, así como también de otra medicación que el individuo pueda estar tomando, como bien sabrán los expertos en la técnica. Además, es obvio que la cantidad eficaz se puede reducir o incrementar dependiendo de la respuesta del sujeto tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que prescriba los compuestos de la presente invención. Por consiguiente, los intervalos de la cantidad eficaz que se han mencionado anteriormente son solamente orientativos y no se pretende que limiten el alcance ni el uso de la invención de ningún modo.

## Sección experimental

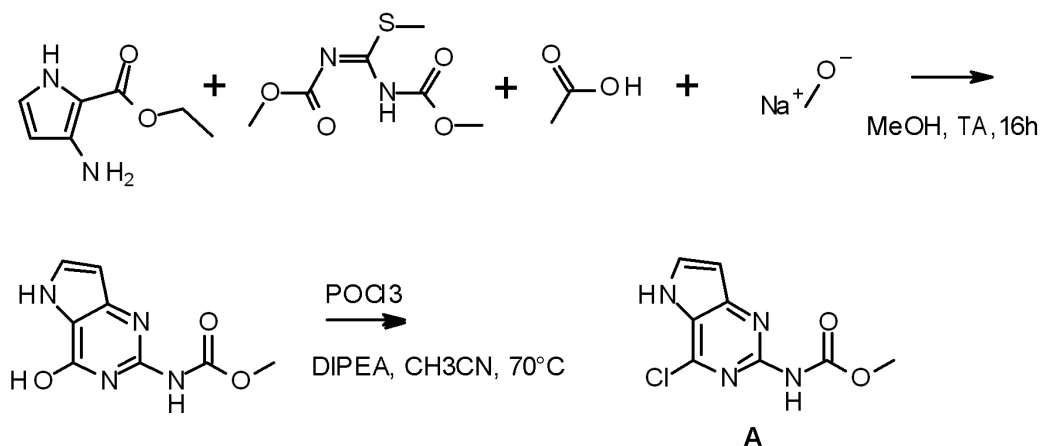
Esquema 1. Esquema de reacción global



Los compuestos de tipo A del esquema 1 se pueden funcionalizar con alcoholes utilizando las condiciones de Mitsunobu en un disolvente polar aprótico, por ejemplo, THF. La escisión del carbamato de metilo se llevó a cabo en

condiciones básicas en 1,4-dioxano para formar el intermedio **C**. El desplazamiento del cloro en **C** se llevó a cabo con un alcohol y una base (p. ej., NaH) en un disolvente polar aprótico (p. ej., NMP) para formar compuestos del tipo **D**.

### 5 Preparación del intermedio **A**



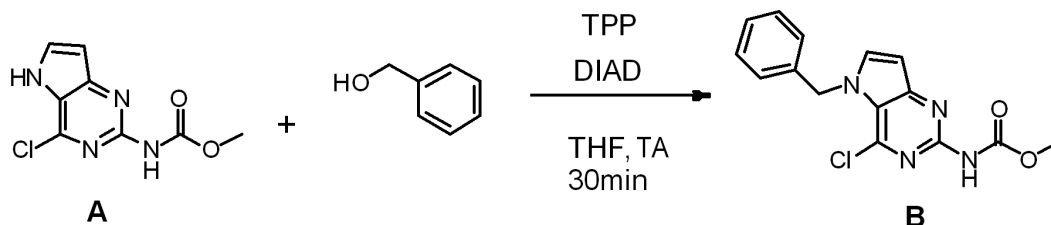
Se repartió clorhidrato de 3-amino-2-etoxicarbonilpirrol (25.8 g, 135.3 mmol) entre diclorometano y NaHCO<sub>3</sub> sat. La capa orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub>, los sólidos se eliminaron por filtración y el disolvente del filtrado se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en metanol (500 mL) junto con 1,3-bis(metoxicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea (32.1 g, 156 mmol) y ácido acético (39 mL, 677 mmol), y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Apareció un precipitado y se continuó agitando durante toda la noche. Se añadió metóxido de sodio (73.1 g, 1353 mmol). Se observó una reacción exotérmica y la mezcla de reacción se agitó durante toda la noche. El pH de la mezcla se ajustó a pH 5 con ácido acético, el precipitado se aisló por filtración y se lavó disgregándolo sobre el filtro con agua (2 x 350 mL), acetonitrilo (350 mL) y éter diisopropílico (350 mL). El *N*-(4-hidroxi-5*H*-pirrolo[3,2-*d*]pirimidin-2-il)carbamato de metilo obtenido se secó en la estufa.

Se dispensó *N*-(4-hidroxi-5*H*-pirrolo[3,2-*d*]pirimidin-2-il)carbamato de metilo (25 g, 120 mmol) en 350 mL de acetonitrilo en un matraz de 500 mL de varias bocas dotado de un agitador suspendido (300 rpm) a temperatura ambiente. Se añadió POCl<sub>3</sub> (22.1 mL, 238.2 mmol) y después la mezcla de reacción se calentó hasta 70 °C con agitación. Se añadió diisopropiletilamina (41.4 mL, 240.2 mmol) gota a gota utilizando una bomba para jeringas con un flujo de 0.2 mL/min.

La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se vertió sobre una solución agitada de acetato de sodio (78.8 g, 961 mmol) en agua (500 mL) a 45 °C. Se evaporaron los componentes orgánicos, y el líquido remanente se agitó y se enfrió en un baño de hielo. El sólido formado se aisló por filtración, se lavó con acetonitrilo y se lavó disgregándolo con éter diisopropílico para obtener el intermedio **A**, el cual se secó al vacío. LC-MS *m/z* = 227 (M+H)

### 30 Preparación del intermedio **B**

Método 1.



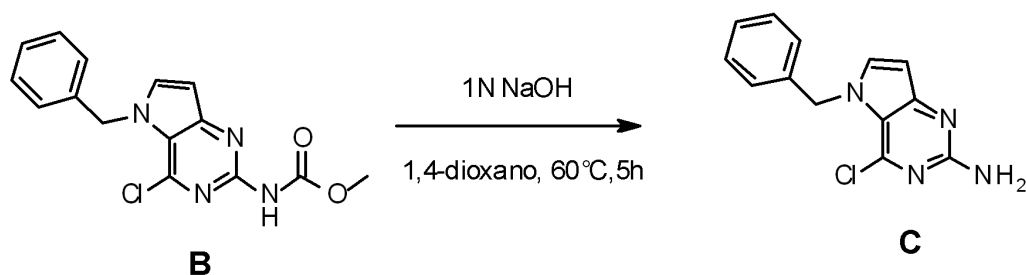
A una suspensión de **A** (500 mg, 2.2 mmol), alcohol bencílico (0.28 mL, 2.6 mmol) y trifenilfosfina (0.69 g, 2.6 mmol) en THF anhidro (15 mL) se añadió DIAD (0.64 mL, 3.3 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se concentró a presión reducida. El producto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando un gradiente de heptanos respecto a acetato de etilo; de 100-0 a 90-10. Se recogieron las fracciones del producto y se concentraron a presión reducida. Se lavó

el producto disgregándolo en éter diisopropílico, se aisló por filtración y se secó al vacío para obtener **B** como un sólido de color amarillo pálido. LC-MS  $m/z = 317$  (M+H)

Método 2 con trifenilfosfina unida a una resina.

5 A una suspensión de **A** (700 mg, 3.1 mmol), alcohol bencílico (0.39 mL, 3.7 mmol) y resina unida a trifenilfosfina (2.6 g, 7.7 mmol) en THF anhidro (21 mL) se añadió DIAD (0.90 mL, 4.6 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se filtró a través de Decalite empacada y se lavó con metanol. El filtrado se concentró al vacío. Se lavó el producto disgregándolo en éter diisopropílico, se aisló por  
10 filtración y se secó al vacío para obtener un sólido de color amarillo pálido, **B**. LC-MS  $m/z = 317$  (M+H)

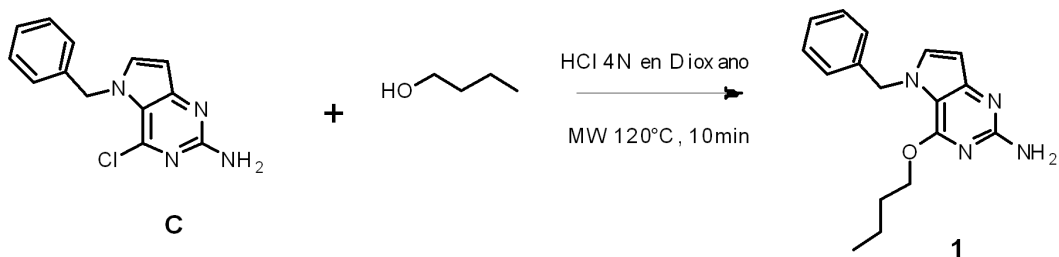
Preparación del intermedio **C**



15 Se disolvió **B** (738 mg, 2.3 mmol) en 1,4-dioxano (11 mL) en un tubo de vidrio de 50 mL y se añadió NaOH (5.6 mL, 1 N ac.). La mezcla se calentó hasta 60 °C durante 5 h. La mezcla se enfrió y se concentró al vacío. El residuo se trató con agua y el precipitado se aisló por filtración y se secó al vacío para obtener **C** como un sólido. El producto se utilizó como tal en el siguiente paso. LC-MS  $m/z = 259$  (M+H)

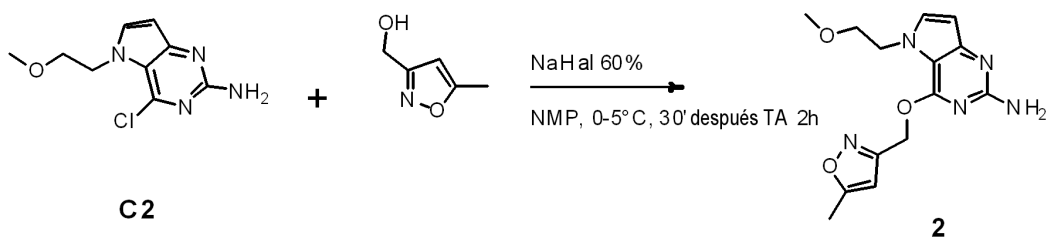
20 Preparación de **1** y **2**

Método 1.



25 El intermedio **C** (240 mg, 0.93 mmol), alcohol *n*-butílico (3.2 mL, 35 mmol), y HCl 4 N en dioxano (0.46 mL, 1.9 mmol) se introdujeron en un vial de microondas de 7 mL. Se selló el vial y la mezcla se calentó en el microondas a 120 °C durante 10 minutos. La mezcla se enfrió y se concentró al vacío. El residuo se neutralizó con una solución sat. de NaHCO<sub>3</sub> y se extrajo con diclorometano. Se separó la capa orgánica, se secó (MgSO<sub>4</sub>), los sólidos se  
30 eliminaron por filtración y el filtrado se concentró a presión reducida. El producto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando un gradiente de diclorometano:metanol de 100:-0 a 95:-5. Se recogieron las mejores fracciones y se concentraron a presión reducida. El producto se lavó disgregándolo en éter diisopropílico, y el sólido se aisló por filtración y se secó al vacío para obtener **1** como un sólido blanco.

35 Método 2.



El intermedio **C2** (250 mg, 1.1 mmol) y 3-hidroximetil-5-metilisoxazol (0.16 mL, 1.65 mmol) se disolvieron en NMP (3 mL) en un vial de 7 mL. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió NaH (66 mg, 1.65 mmol, dispersión al 60% en aceite mineral) en atmósfera de N<sub>2</sub>, y la mezcla se agitó a 0-5 °C durante 30 minutos y después se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se continuó agitando durante 2 h. A continuación, la mezcla de reacción cruda se purificó mediante HPLC preparativa (fase estacionaria: RP Vydac Denali C18 10 μm, 200 g, 5 cm), fase móvil: solución de NH<sub>4</sub>OAc al 0.25% en agua, CH<sub>3</sub>CN), se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron al vacío. El producto se cristalizó en CH<sub>3</sub>CN, se aisló por filtración y se secó al vacío para obtener un sólido blanco, **2**.

Tabla 1. Compuestos de fórmula (I) y sus datos analíticos correspondientes. Los compuestos se prepararon de acuerdo con los métodos descritos en la sección experimental.

#	ESTRUCTURA	<sup>1</sup> H RMN	Método de LC, t <sub>R</sub> (min)	Masa experimental de LC-MS (M+H)
1		<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 0.85 (t, J=7.37 Hz, 3 H) 1.26 (dc, J=15.02, 7.39 Hz, 2 H) 1.56 - 1.63 (m, 2 H) 4.30 (t, J=6.38 Hz, 2 H) 5.39 (s, 2 H) 5.72 (s, 2 H) 6.08 (d, J=3.08 Hz, 1 H) 7.03 - 7.08 (m, 2 H) 7.19 - 7.25 (m, 1 H) 7.26 - 7.32 (m, 2 H) 7.48 (d, J=3.08 Hz, 1 H)	B, 1.98	297
2		<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 2.41 (d, J=0.66 Hz, 3 H) 3.17 (s, 3 H) 3.57 (t, J=5.50 Hz, 2 H) 4.29 (t, J=5.50 Hz, 2 H) 5.50 (s, 2 H) 5.82 (s, 2 H) 6.03 (d, J=2.86 Hz, 1 H) 6.37 (d, J=0.88 Hz, 1 H) 7.35 (d, J=2.86 Hz, 1 H)	A, 0.69	304
3		<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 2.33 - 2.38 (m, 3 H) 3.79 (s, 3 H) 5.34 (s, 2 H) 5.38 (s, 2 H) 5.75 (s, 1 H) 5.86 (s, 2 H) 6.12 (d, J=3.08 Hz, 1 H) 6.40 - 6.47 (m, 1 H) 6.78 (td, J=7.48, 0.66 Hz, 1 H) 7.00 (d, J=7.92 Hz, 1 H) 7.24 (td, J=7.80, 1.80 Hz, 1 H) 7.43 (d, J=2.86 Hz, 1 H)	B, 1.62	366



ES 2 645 950 T3

#	ESTRUCTURA	<sup>1</sup> H RMN	Método de LC, t <sub>R</sub> (min)	Masa experimental de LC-MS (M+H)
4		<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 0.77 (t, J=7.4 Hz, 3 H), 1.12 (dc, J=15.0, 7.4 Hz, 2 H), 1.40 - 1.50 (m, 2 H), 4.21 (t, J=6.4 Hz, 2 H), 5.49 (s, 2 H), 5.73 6 (s, 2 H), 6.11 (d, J=2.9 Hz, 1 H), 6.65 (d, J=7.9 Hz, 1 H), 7.21 - 7.28 (m, 1 H), 7.47 (d, J=3.1 Hz, 1 H), 7.69 (td, J=7.7, 1.8 Hz, 1 H), 8.47 - 8.53 (m, 1 H)	A, 0.81	298
5		<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 2.35 (s, 3 H) 5.37 (s, 2 H) 5.47 (s, 2 H) 5.84 - 5.90 (m, 3 H) 6.14 (d, J=2.86 Hz, 1 H) 6.72 (d, J=7.92 Hz, 1 H) 7.24 (dd, J=6.93, 4.95 Hz, 1 H) 7.52 (d, J=3.08 Hz, 1 H) 7.65 (td, J=7.70, 1.76 Hz, 1 H) 8.47 (d, J=4.18 Hz, 1 H)	B, 1.29	337
6		<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 2.57 (s, 3 H) 5.45 (s, 2 H) 5.51 (s, 2 H) 5.85 (s, 2 H) 6.13 (d, J=2.86 Hz, 1 H) 6.85 (d, J=7.70 Hz, 1 H) 7.22 (dd, J=7.04, 5.06 Hz, 1 H) 7.52 (d, J=3.08 Hz, 1 H) 7.64 (td, J=7.65, 1.65 Hz, 1 H) 8.43 (d, J=4.18 Hz, 1 H)	B, 1.14	338
7		<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 2.36 (s, 3 H) 3.74 (s, 3 H) 3.71 (s, 3 H) 5.29 (s, 2 H) 5.40 (s, 2 H) 5.85 (s, 2 H) 5.93 (s, 1 H) 6.12 (d, J=3.08 Hz, 1 H) 6.29 (d, J=7.92 Hz, 1 H) 7.11 (d, J=7.92 Hz, 1 H) 7.50 (d, J=3.08 Hz, 1 H)	B, 1.45	397
8		<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 2.36 (s, 3 H) 3.80 (s, 3 H) 5.31 (s, 2 H) 5.48 (s, 2 H) 5.75 - 5.81 (m, 3 H) 6.07 (d, J=2.86 Hz, 1 H) 7.25 (dd, J=8.25, 4.73 Hz, 1 H) 7.36 - 7.41 (m, 2 H) 7.90 (dd, J=4.73, 0.99 Hz, 1 H)	A, 0.72	367
9		<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ ppm 2.23 (d, J=1.10 Hz, 3 H) 3.77 (s, 3 H) 5.32 (s, 2 H) 5.45 (s, 2 H) 5.77 (s, 2 H) 6.07 (d, J=2.86 Hz, 1 H) 6.79 (d, J=1.10 Hz, 1 H) 7.21 (dd, J=8.25, 4.73 Hz, 1 H) 7.33 (dd, J=8.36, 1.32 Hz, 1 H) 7.37 (d, J=2.86 Hz, 1 H) 7.88 (dd, J=4.73, 1.21 Hz, 1 H)	B, 1.26	367

#	ESTRUCTURA	<sup>1</sup> H RMN	Método de LC, t <sub>R</sub> (min)	Masa experimental de LC-MS (M+H)
10		<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ ppm 2.34 - 2.41 (m, 3 H) 5.49 (s, 2 H) 5.58 (s, 2 H) 5.88 (s, 2 H) 6.15 (d, J=2.86 Hz, 1 H) 6.72 (d, J=7.92 Hz, 1 H) 7.20 - 7.25 (m, 1 H) 7.43 (d, J=1.10 Hz, 1 H) 7.52 (d, J=2.86 Hz, 1 H) 7.63 (td, J=7.70, 1.76 Hz, 1 H) 8.46 (dd, J=4.73, 0.77 Hz, 1 H)	B, 1.28	353
11		<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ ppm 2.24 (s, 3 H) 5.39 (s, 2 H) 5.43 (s, 2 H) 5.85 (s, 2 H) 6.13 (d, J=2.86 Hz, 1 H) 6.76 (d, J=7.70 Hz, 1 H) 6.81 (s, 1 H) 7.21 (dd, J=6.93, 5.17 Hz, 1 H) 7.52 (d, J=2.86 Hz, 1 H) 7.62 (td, J=7.65, 1.43 Hz, 1 H) 8.40 - 8.45 (m, 1 H)	B, 1.18	337

### Métodos analíticos.

#### Procedimiento general de LCMS

- 5 La medición por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se llevó a cabo utilizando una bomba de LC, un haz de diodos (DAD) o un detector de UV y una columna, según se especifique en los métodos respectivos. Cuando fue necesario, se incluyeron detectores adicionales (remítase a la tabla de los métodos que se presenta más adelante).
- 10 El flujo procedente de la columna se introdujo en un espectrómetro de masas (MS), el cual estaba configurado con una fuente de iones a presión atmosférica. Un experto en la técnica será capaz de fijar los parámetros ajustables (p. ej., intervalo de barrido, tiempo de permanencia, etc.) para obtener iones que permitan identificar el peso molecular monoisotópico nominal del compuesto (PM). La adquisición de datos se llevó a cabo con el software adecuado.
- 15 Los compuestos se describen según sus tiempos de retención experimentales (t<sub>R</sub>) e iones. Si no se especifica de otro modo en la tabla de datos, el ión molecular descrito corresponde a [M+H]<sup>+</sup> (molécula protonada) y/o [M-H]<sup>-</sup> (molécula desprotonada). En el caso de que el compuesto no se pueda ionizar directamente, se especifica el tipo de aducto (es decir, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, [M+HCOO]<sup>-</sup>, etc.). Para moléculas con múltiples patrones isotópicos (Br, Cl...), el valor indicado es el que se obtiene para la masa isotópica más baja. Todos los resultados se obtuvieron con las incertidumbres experimentales que se asocian habitualmente con el método utilizado.
- 20 En lo sucesivo en la presente, "SQD" significa detector de cuadrupolo único, "MSD" detector selectivo de masas, "TA" temperatura ambiente, "BEH" híbrido con puente de etilsiloxano/sílice, "DAD" detector de haz de diodos, "HSS" sílice de alta resistencia, "Q-ToF" espectrómetros de masas con cuadrupolo de tiempo de vuelo, "CLND", detector de nitrógeno quimioluminiscente, "ELSD" detector de barrido de luz evaporativo.
- 25

Códigos del método de LCMS (el flujo se expresa en mL/min; la temperatura de la columna (T col) en °C; el tiempo de análisis en minutos).

Código del método	Instrumento	Columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- T col ----- 55	Tiempo de análisis
A	Waters: Acquity® UPLC® - DAD y SQD	Waters: BEH C18 (1.7 μm, 2.1*50 mm)	A: CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 10 mM en 95% de H <sub>2</sub> O + 5% de CH <sub>3</sub> CN B: CH <sub>3</sub> CN	Desde un 95% de A hasta un 5% de A en 1.3 min, se mantiene durante 0.7 min	0.8 ----- 55	2

Código del método	Instrumento	Columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- T col	Tiempo de análisis
<b>B</b>	Waters: Acquity® UPLC® - DAD y SQD	Waters: HSS T3 (1.8 µm, 2.1*100 mm)	A: CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 10 mM en 95% de H <sub>2</sub> O + 5% de CH <sub>3</sub> CN B: CH <sub>3</sub> CN	Desde un 100% de A hasta un 5% de A en 2.10 min, hasta un 0% de A en 0.90 min, hasta un 5% de A en 0.5 min	0.8 ----- 55	3.5

#### Actividad biológica de los compuestos de fórmula (I) y (II)

#### **Descripción de los ensayos biológicos**

##### 5 **Evaluación de la actividad de TLR7 y TLR8**

Se evaluó la capacidad de los compuestos para activar TLR7 y/o TLR8 humano en un ensayo con marcadores celulares utilizando células HEK293 transfectadas de forma transitoria con un vector de expresión de TLR7 o TLR8 y un constructo marcador NFκB-luc.

10 Resumiendo, se cultivaron células HEK293 en medio de cultivo (DMEM suplementado con un 10% de FCS y glutamina 2 mM). Para la transfección de las células en placas de 15 cm, las células se desprendieron con tripsina-EDTA, se transfectaron con una mezcla de plásmido TLR8 o CMV-TLR7 (1700 ng), plásmido NFκB-luc (850 ng) y un reactivo de transfección, y se incubaron durante 48 h a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>. A  
15 continuación, las células transfectadas se lavaron en PBS, se desprendieron con tripsina-EDTA y se volvieron a suspender en el medio hasta obtener una densidad de  $1.25 \times 10^5$  células/mL. A continuación, se dispensaron cuarenta microlitros de células en cada pocillo de placas de 384 pocillos, en las que ya había 200 nL de compuesto en un 100% de DMSO. Después de 6 horas de incubación a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>, se determinó la actividad de luciferasa añadiendo 15 µL de sustrato Steady Lite Plus (Perkin Elmer) a cada pocillo y la lectura se realizó con un  
20 generador de imágenes de microplacas ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Se generaron curvas de dosis-respuesta a partir de mediciones realizadas por cuadruplicado. Se determinaron los valores de la concentración mínima eficaz (CME), que se define como la concentración que induce un efecto que es al menos dos veces superior a la desviación estándar del ensayo, para cada compuesto.

25 La toxicidad del compuesto se determinó en paralelo utilizando una dilución en serie similar del compuesto con 40 µL por pocillo de células transfectadas con el constructo CMV-TLR7 solo ( $1.25 \times 10^5$  células/mL), en placas de 384 pocillos. La viabilidad de las células se midió después de 6 horas de incubación a 37 °C y con un 5% de CO<sub>2</sub> añadiendo 15 µL de ATP lite (Perkin Elmer) por pocillo y realizando la lectura con un generador de imágenes de microplacas ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Los datos se registraron como CC<sub>50</sub>.

30 En paralelo, se utilizó una dilución en serie similar del compuesto (200 nL de compuesto en un 100% de DMSO) con 40 µL por pocillo de células transfectadas con el constructo marcador NFκB-luc solo ( $1.25 \times 10^5$  células/mL). Después de seis horas de incubación a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>, se determinó la actividad de luciferasa añadiendo 15 µL de sustrato Steady Lite Plus (Perkin Elmer) a cada pocillo y la lectura se realizó con un generador de  
35 imágenes de microplacas ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Los datos de los sistemas celulares de cribado inverso se presentan como CME.

#### **Activación de elementos promotores de ISRE**

40 También se evaluó el potencial de los compuestos para inducir IFN-I midiendo la activación de elementos de respuesta estimulados por interferón (ISRE, por sus siglas en inglés) por parte de medios acondicionados de PBMC. El elemento ISRE de secuencia GAAACTGAACT es muy sensible al factor de transcripción STAT1-STAT2-IRF9, que se activa cuando el IFN-I se une a su receptor IFNAR (Clontech, PT3372-5W). El plásmido pISRE-Luc de Clontech (ref. 631913) contiene 5 copias de este elemento ISRE seguidas de la luciferasa de luciérnaga ORF. Se  
45 estableció una línea celular HEK293 transfectada de forma estable con pISRE-Luc (HEK-ISRELuc) para analizar los medios de cultivo de células PBMC acondicionadas.

Resumiendo, se prepararon PBMC a partir de capas leucocitarias de al menos dos donantes utilizando un protocolo estándar de centrifugación de Ficoll. Las PBMC aisladas se volvieron a suspender en medio RPMI suplementado  
50 con un 10% de suero AB humano y se dispensaron  $2 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 384 pocillos que contenían los compuestos (70 µL de volumen total). Después de incubárlas durante toda la noche, se transfirieron 10 µL de sobrenadante a placas de 384 pocillos que contenían  $5 \times 10^3$  células HEK-ISRELuc/pocillo en 30 µL (que se habían colocado en las placas el día anterior). Después de 24 horas de incubación, se midió la activación de los elementos

5 ISRE mediante el análisis de la actividad de luciferasa utilizando 40 µL/pocillo de sustrato Steady Lite Plus (Perkin Elmer), la cual se midió con un generador de imágenes de microplacas ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). La actividad estimuladora de cada compuesto sobre las células HEK-ISRE luc se indicó como un valor de CME, que se define como la concentración del compuesto aplicada a las PBMC que provoca una actividad de luciferasa de al menos el doble de la desviación estándar del ensayo. A su vez, la CME indica el grado de activación del ISRE cuando se transfiere una cantidad definida de medio de cultivo de PBMC. Se utilizó el interferón  $\alpha$ -2a recombinante (Roferón-A) como compuesto de control estándar.

10 Tabla 2. Actividad de los compuestos de fórmula (I).

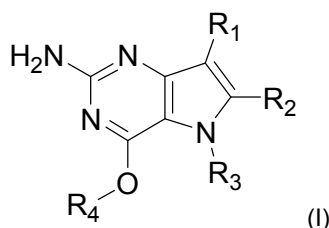
Todos los compuestos presentaron una  $CC_{50} > 24 \mu\text{M}$ .

#	TLR 7 humano (CME) $\mu\text{M}$	TLR 8 humano (CME) $\mu\text{M}$	HEK-ISRE luc (CME) $\mu\text{M}$
1	0.6	>25	0.4
2	2.7	>25	0.5
3	0.1	>25	0.03
4	1.4	>25	0.6
5	0.4	>25	0.1
6	3.9	>25	2
7	0.08	>25	0.03
8	0.03	>25	0.01
9	0.07	>25	ND
10	0.5	>25	ND
11	0.6	>25	ND

15 ND = no disponible.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



y una de sus sales, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables, donde

10 R<sub>1</sub> es H, flúor o metilo;

R<sub>2</sub> es H, halógeno o alquilo C<sub>1-3</sub>;

15 R<sub>3</sub> es alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre arilo, heterociclo, halógeno, arilo, alquilamino, dialquilamino, alquilo C<sub>1-6</sub>, ácido carboxílico, éster carboxílico, amida carboxílica, nitrilo o alcoxi C<sub>1-6</sub>;

o donde

20 R<sub>3</sub> es un alquilarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, arilo, arilo, alquilamino, dialquilamino, alquilo C<sub>1-6</sub>, ácido carboxílico, éster carboxílico, amida carboxílica, sulfonamida, nitrilo o alcoxi C<sub>1-6</sub>;

25 R<sub>4</sub> es alquilo C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre hidroxilo, alquilo C<sub>1-6</sub>, cicloalquilo C<sub>3-7</sub>, alqueno C<sub>2-6</sub> o arilo opcionalmente sustituido además con alquilo C<sub>1-6</sub>, y cicloalquilo C<sub>3-7</sub> opcionalmente sustituido además con alquilo C<sub>1-6</sub>;

o donde

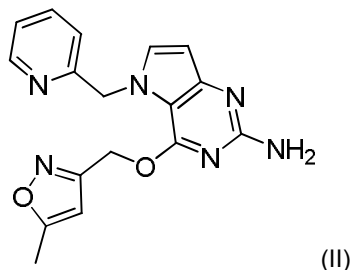
30 R<sub>4</sub> es un alquilarilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre halógeno, arilo, arilo, alquilamino, dialquilamino, alquilo C<sub>1-6</sub>, ácido carboxílico, éster carboxílico, amida carboxílica, sulfonamida, nitrilo o alcoxi C<sub>1-6</sub>.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde R<sub>3</sub> es un grupo CH<sub>2</sub>-arilo (sustituido o no sustituido), y R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> se describen como en la reivindicación 1.

35 3. Un compuesto de fórmula (I), donde R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son ambos grupos CH<sub>2</sub>-arilo opcionalmente sustituidos además como se ha descrito en la reivindicación 1, y donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son como se han descrito en la reivindicación 1.

40 4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde R<sub>1</sub> es flúor, R<sub>2</sub> es hidrógeno, y R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> se describen como en la reivindicación 1.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la siguiente estructura química:



45 6. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) o (II) o una de sus sales, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1 o 5, junto con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

50 7. Un compuesto de fórmula (I) o (II), o una de sus sales, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1 o 5, o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto de fórmula (I)

o (II), o una de sus sales, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso como medicamento.

- 5 8. Un compuesto de fórmula (I) o (II), o una de sus sales, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 5, o dicha composición farmacéutica que comprende dicho compuesto de fórmula (I) o (II), o una de sus sales, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso en el tratamiento de cualquier trastorno el cual implique la modulación de TLR7.