

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 813**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2009 PCT/US2009/061867**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.04.2010 WO10048520**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2009 E 09822779 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2341933**

54 Título: **Derivados de imidazoquinolina lipidados**

30 Prioridad:

**24.10.2008 US 108210 P**

**09.07.2009 US 224226 P**

**30.07.2009 US 229933 P**

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

**28.02.2018**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)**

**Rue de l'Institut 89**

**1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**JOHNSON, DAVID**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 656 813 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 imidazoquinolina lipidados

**Antecedentes**

5 La presente invención se refiere a novedosos compuestos adyuvantes, a procedimientos para su preparación, a composiciones que los contienen, y a su uso como adyuvantes de vacunas.

10 El refinamiento y la simplificación de las vacunas microbianas y el uso de antígenos subunitarios sintéticos y recombinantes para mejorar la posibilidad de elaboración y la seguridad de las vacunas han dado como resultado una disminución en la potencia de las vacunas. Esto ha conducido a estudios sobre la co-administración de adyuvantes con antígenos para potenciar la actividad de la vacuna y la débil inmunogenicidad de los epítopos sintéticos y recombinantes. Los adyuvantes son aditivos que mejoran las respuestas inmunitarias humorales y/o mediadas por células a un antígeno de vacuna. El diseño de adyuvantes de vacunas, sin embargo, ha sido históricamente difícil, debido a la compleja naturaleza de los mecanismos moleculares involucrados en la función del sistema inmunológico. Aunque se ha conocido durante mucho tiempo la adición de componentes microbianos para mejorar las respuestas inmunitarias adaptables, sólo recientemente se demostró que los receptores tipo toll (TLR) que se encuentran en las células involucradas en la vigilancia inmunitaria, tales como las células epiteliales y dendríticas, se acoplan con muchos de estos productos microbianos por medio de los denominados como "patrones asociados con patógenos" o PAMP. Muchos adyuvantes de vacunas e inmunomoduladores independientes parecen interactuar con los miembros de la familia TLR.

20 De los 10 TLR conocidos que se han identificado en los seres humanos, cinco están asociados con el reconocimiento de los componentes bacterianos (TLR 1, 2, 4, 5, 6), y otros cuatro (TLR 3, 7, 8, 9) parecen estar restringidos a los compartimientos citoplásmicos, y están involucrados en la detección del ARN vírico (TLR 3, 7, 8), y el ADN no metilado (TLR9) (Iwasaki, A., Nat Immunol 2004, 5, 987). La activación de los TLR regula las sendas de señalización intracelular y conduce a la expresión genética por medio de la interacción con las moléculas adaptadoras intracelulares, tales como MyD88, TRIF, TIRAP, y TRAM (Akira, S. Nat Rev Immunol 2004, 4, 499; Takeda, K. Semin Immunol 2004, 16, 3). Estas moléculas adaptadoras pueden regular diferencialmente la expresión de las citocinas inflamatorias/quimiocinas y los interferones tipo I (IFN $\alpha$ /b), lo cual puede conducir a la mejora preferencial de las respuestas inmunitarias humorales y mediadas por las células específicas del antígeno (Zughaier, S. Infect Immun 2005, 73, 2940). La inmunidad humoral es la principal línea de defensa contra los patógenos bacterianos, mientras que la inducción de los linfocitos citotóxicos-T (CTL) parece ser crucial para la inmunidad protectora en el caso de enfermedad vírica y cáncer.

30 Actualmente, un grupo de sales de aluminio conocidas como alum son los adyuvantes dominantes utilizados en las vacunas humanas. Pero el alum típicamente sólo mejora la inmunidad humoral (Th2), y en general se utiliza intramuscularmente debido a la toxicidad local por otras vías (por ejemplo, la inoculación subcutánea o intradérmica conduce a granulomas) (Aguilar, J. Vaccine 2007, 25, 3752). Otros efectos secundarios potenciales del alum incluyen un aumento en la producción de IgE, alergenicidad y neurotoxicidad. Por consiguiente, se necesitan nuevos adyuvantes de vacunas seguros y efectivos que sean capaces de estimular las respuestas inmunitarias tanto de anticuerpos como de tipo Th1, y que sean compatibles con diferentes vías de administración y formulaciones de antígeno.

40 En el caso de la activación de TLR7 y TLR8, se han identificado unas cuantas clases diferentes de miméticos de molécula pequeña de los ligandos de ssARN víricas naturales (ricos en U y/o G). Éstos incluyen ciertos compuestos antivíricos relacionados con los metabolitos de guanosina oxidada (oxo-guanosinas), los cuales interactúan primordialmente con TLR7 (Heil, F. Eur J Immunol 2003, 33, 2987; Hemmi, 2002), y los derivados de adenina que se acoplan con TLR7 y/o TLR8. La capacidad inmuno-estimulante de estos compuestos se ha atribuido a las sendas de señalización dependientes de TLR/MyD88 y a la producción de citocinas, incluyendo IL-6 e interferones tipo I (en particular interferón- $\alpha$ ) y II. La activación de TLR7 o TLR8 conduce a la sobre-regulación de las moléculas co-estimulantes (por ejemplo, CD-40, CD-80, CD-86), y de las moléculas MHC clase I y II sobre las células dendríticas (DC). Las células dendríticas (DC) son las principales células del sistema inmunológico involucradas en la absorción y presentación de antígenos para los linfocitos-T. Las células dendríticas plasmacitoides (pDC), las cuales expresan preferencialmente TLR7, son células productoras de interferón- $\alpha$  profesionales; mientras que las mDC expresan solamente TLR8. La activación de TLR8 en las mDC conduce a la producción preferencial de citocinas pro-inflamatorias, tales como IL-12, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , y la inmunidad mediada por células (CMI).

55 Una clase de derivados de adenina que ha recibido una cantidad de atención considerable, es la de las 1H-imidazo-[4,5-c]-quinolinas (IQ). Se encontró que el miembro prototípico de esta clase, imiquimod (R847, S-26398), es efectivo contra las infecciones por el virus de papiloma genital, queratosis actínica, y carcinoma de células basales cuando se aplica tópicamente en forma de crema. Sin embargo, el imiquimod tiene una actividad inductora de interferón relativamente baja, y tanto las preparaciones orales como tópicas presentan efectos secundarios. De hecho, se reportaron efectos secundarios serios en un estudio clínico de HCV con imiquimod. La "huella" inmunológica grande de los agonistas de TLR7 en general ha conducido a preocupaciones sobre la toxicidad: Recientemente se suspendieron los estudios clínicos con otro agonista de TLR7, ANA-975, un derivado de oxo-

guanosina, debido a las cuestiones de la toxicidad.

Otro miembro de la clase IQ de ligandos TLR7/8 y un derivado de un metabolito de imiquimod es el resiquimod. El resiquimod (R-848, S-28609) también activa TLR7 en los macrófagos y en las células dendríticas (DC) de una manera dependiente de MyD88, ya sea directa o indirectamente por medio de una molécula accesoria, y sobre-regula las moléculas co-estimulantes y MHCII en las células dendríticas (DC). Pero, en contraste con el imiquimod, el resiquimod más potente y tóxico, también es un ligando para la señalización de TLR8, que conduce a la reversión de la función de las células reguladoras de CD4+ (Treg). Utilizando células HEK293 transfectadas, recientemente se demostró que los agonistas de TLR7 son más efectivos para generar el IFN- $\alpha$  y las citocinas reguladas por IFN, mientras que los agonistas de TLR8 fueron más efectivos para inducir las citocinas pro-inflamatorias, tales como TNF- $\alpha$  e IL-12, sugiriendo que la activación de TLR7 puede ser más importante para las respuestas de anticuerpos (respuestas de tipo Th2), mientras que la activación de TLR8 debería impulsar las respuestas inmunitarias de CMI o de tipo Th1. Sin embargo, como se menciona anteriormente, muchos agonistas de TLR7/8 con frecuencia exhiben propiedades tóxicas, son inestables, y/o tienen efectos inmunoestimulantes insustanciales. Por consiguiente, el descubrimiento y el desarrollo de adyuvantes efectivos y seguros que activen TLR7 y/o TLR8 es esencial para mejorar la eficacia y la seguridad de las vacunas existentes y nuevas mediante una ayuda para controlar la magnitud, dirección, y duración de la respuesta inmunitaria contra los antígenos.

A diferencia de TLR2 y TLR4, los cuales reconocen los PAMP sobre las superficies celulares, Los PAMP de TLR7/8 se detectan en los compartimientos endosómico/lisosómico, y requieren de la maduración endosómica. La absorción celular es un requisito previo para la activación celular en el caso de los ligandos de TLR7/8 naturales y zenobióticos, tales como imiquimod y resiquimod. Por consiguiente, las estrategias que aumentarían la penetración del ligando de TLR7/8 en las células dendríticas (DC) y en otras células inmunitarias, podrían mejorar la activación de TLR y la eficacia de la vacuna, así como podría mitigar los efectos tóxicos.

En la técnica se conocen conjugados de lípido de fármacos de nucleósidos, para mejorar la biodisponibilidad oral en general, así como para permitir la incorporación del "nucleolípido" resultante en las membranas de lípido de los liposomas. La incorporación inestable y/o tóxica en los liposomas establece un sistema portador de liberación lenta o un depósito molecular, el cual protege al fármaco de la degradación y reduce los efectos secundarios tóxicos. Se ha reportado que la potencia de estos "pro-fármacos de lípido" es comparable con aquella de los fármacos no derivados (documento US 5.827.831 - NeXstar). En la técnica se han reportado preparaciones de depósito de imidazoquinolinas e IQ aciladas grasas, para los propósitos de mantener la IQ durante un período prolongado dentro de una región de tejido localizada, para disminuir el metabolismo y la toxicidad (Publicación Internacional Número WO 2005/001022 - 3M). Sin embargo, la conjugación de una imidazoquinolina con un fosfo- o fosfolípido de una manera específica, con el objeto de facilitar la absorción de las células inmunitarias, cuando se administran solos o en una formulación de depósito con un antígeno, y para mejorar la activación de TLR7/8 endosómico y la presentación del antígeno, no es conocida en la materia. Las mejores respuestas inmunitarias con los compuestos de la presente invención posiblemente se deben a la interacción directa de los compuestos de la fórmula (I) con el TLR7 y/o TLR8 endosómico, y/o a la interacción de un metabolito activo después de la acción enzimática.

### **Breve descripción de la invención**

Se ha demostrado que los compuestos de la invención son inductores de interferón- $\alpha$ , IL-12 y otras citocinas inmunoestimulantes, y pueden poseer un mejor perfil de actividad-toxicidad en comparación con los inductores de citocina conocidos, cuando se utilizan como adyuvantes para antígenos de vacunas in el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades infecciosas y cáncer. Estos compuestos también son novedosos por sí mismos.

### **Descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra una representación esquemática del diseño del estudio.

La Figura 2 muestra la respuesta de CD8 específica de p27.

La Figura 3 muestra la actividad citotóxica específica de p27 detectada *in vivo*.

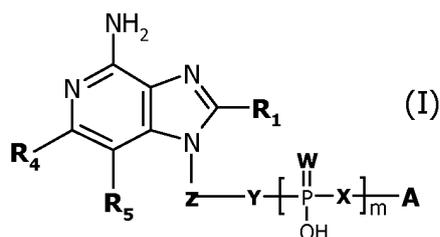
La Figura 4 ilustra la respuesta de células-T CD4 específica del antígeno.

La Figura 5 muestra la respuesta de citocina en suero en los grupos inmunizados con las formulaciones basadas en liposomas sin (-) o con diferentes cantidades de los ligandos de TLR7/8 junto con QS21 y MPL.

La Figura 6 muestra la respuesta de citocina en suero en los grupos inmunizados con las formulaciones basadas en emulsión sin (-) o con diferentes cantidades de ligandos de TLR7/8 junto con QS21 y MPL.

### **Sumario de la invención**

Los compuestos de la presente invención son moléculas adyuvantes que comprenden una molécula de imidazoquinolina, que puede enlazarse covalentemente a un grupo fosfo- o fosfolípido. Los compuestos de la presente invención se describen ampliamente por la fórmula I:



en el que

**R<sub>1</sub>** = H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-amino, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-amino, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-amino, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; ramificados o no ramificados, y opcionalmente sustituidos terminalmente con un grupo hidroxilo, amino, tio, hidrazino, hidrazido, azido, acetilenilo, carboxilo, o maleimido;

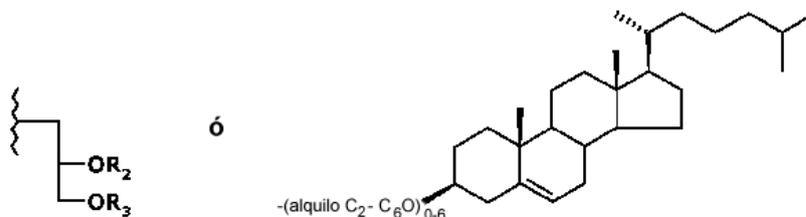
**Z** = alquilo o alqueniilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, no sustituido o terminalmente sustituido con -(O-alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>1-6</sub>-**Y** = O, NH

**X** = O, CH<sub>2</sub>, CF<sub>2</sub>

**W** = O o S

**m** = 1-2;

**A** =



en donde:

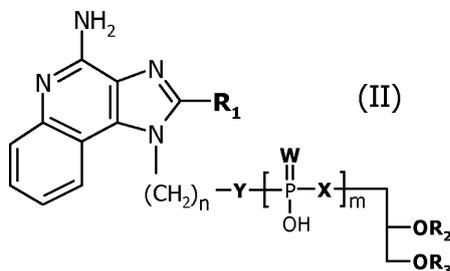
**R<sub>2</sub>** = H, o alquilo C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub> recto/ramificado/insaturado o acilo

**R<sub>3</sub>** = alquilo C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub> recto/ramificado/insaturado o acilo

**R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>** = independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno, o trifluorometilo; o tomados juntos forman de una manera alternativa un anillo de 6 miembros, heteroarilo que contiene un átomo de nitrógeno, cicloalquilo, o un anillo de heterocicloalquilo que contiene un átomo de nitrógeno; no sustituidos o sustituidos con uno o más de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno, o trifluorometilo;

o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En una realización, los compuestos de la presente invención se describen más específicamente por la fórmula II:



en la que

**R<sub>1</sub>** = H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-amino, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-amino, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-amino, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; ramificados o no ramificados, y opcionalmente sustituidos terminalmente con un grupo hidroxilo, amino, tio, hidrazino, hidrazido, azido, acetilenilo, carboxilo, o maleimido,

**n** = 1-6

**Y** = O, NH

**X** = O, CH<sub>2</sub>, CF<sub>2</sub>

**W** = O o S

**m** = 1-2,

**R<sub>2</sub>** = H o alquilo C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub> recto/ramificado/insaturado o acilo;

$R_3$  = alquilo  $C_4$ - $C_{24}$  recto/ramificado/insaturado o acilo (por ejemplo, *fosfatidilo*, *lisofosfatidil-éter* o *-éster* cuando  $W = O$ ,  $X = O$ ,  $m = 1$ )

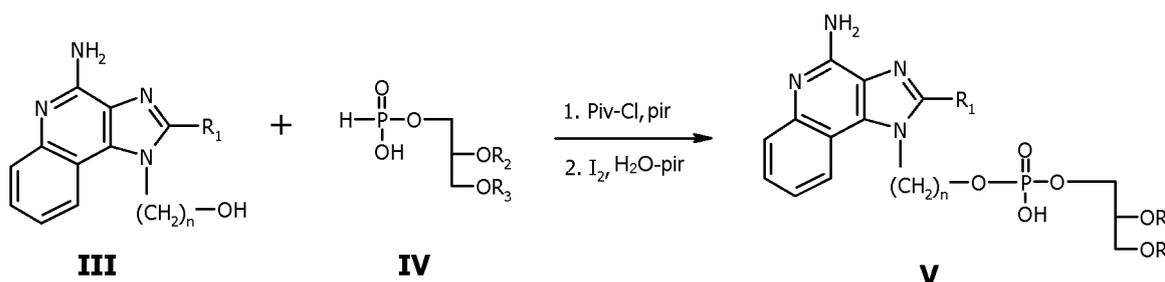
TABLA 1

Ejemplo	Ref. No.	$R_1$	n	m
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	L1	H	2	1
4	L2	n-Bu	2	1
5	L3	CH <sub>2</sub> OEt	2	1
6	L4	CH <sub>2</sub> OEt	4	1
7	-	-	-	-
8	L5	CH <sub>2</sub> OEt	2	2
9	-	-	-	-

Para todos los Ejemplos mostrados:  $Y = W = X = O$ ;  $R_2 = R_3 =$  hexadecanoílo

### 5 Ejemplo 1

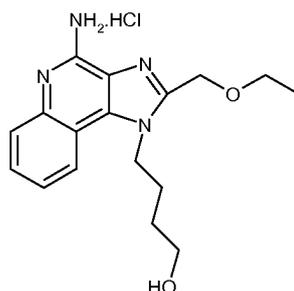
Procedimiento general para la preparación de 4-amino-1-[2-(1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo)-alquil]-1H-imidazo-[4,5-c]-quinolinas (Compuesto (I),  $Y = W = X = O$ ,  $m = 1$ ).



Se prepararon diglicéridos del monofosfato de imidazoquinolina **V** mediante el acoplamiento de las 4-amino-1-hidroxi-alquil-imidazoquinolinas **III** (Gerster y colaboradores, *J Med Chem* 2005, 48, 3481; Izumi y colaboradores, *Bioorg Med Chem* 2003, 11, 2541) con el 1-H fosfonato **IV** de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica (Crossman y colaboradores, *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, 1997, 2769; Westerduin, y colaboradores, *Tet Lett*, 1986, 15, 6271; Nikolaev y colaboradores, *Carbohydr Res*, 1990, 204, 65) como sigue: La imidazoquinolina **III** (1 equivalente), y el H-fosfonato **IV** (2 equivalentes) se suspendieron en n-heptano y, después de la evaporación del solvente, se secaron durante la noche bajo un alto vacío. El residuo resultante se disolvió en piridina (compuesto **III** 0,01 M), se trató con cloruro de pivaloílo (12,4 equivalentes), y entonces se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Se agregó una solución de yodo (4 equivalentes) en 19:1 de piridina-agua (0,04 M), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, y entonces se dividió entre CHCl<sub>3</sub> y Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> acuoso 1 M. Las capas se separaron, y la capa acuosa se extrajo dos veces con CHCl<sub>3</sub>. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con regulador de borato de trietilamonio 1 M (pH de 8), se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y se concentraron. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía por evaporación instantánea sobre gel de sílice (elución en gradiente, 0→25 por ciento de MeOH-CHCl<sub>3</sub>), y entonces mediante cromatografía en fase inversa (Bakerbond C8 en CH<sub>3</sub>CN conteniendo trietil-amina al 1 por ciento, eluyendo con 0→60 por ciento de MeOH-CH<sub>3</sub>CN conteniendo Et<sub>3</sub>N al 1 por ciento), para proporcionar el compuesto **V** como un sólido incoloro.

### 25 Ejemplo 2

Preparación de clorhidrato de 4-amino-1-(4-hidroxi-butil)-2-etoxi-metil-1H-imidazo-[4,5-c]-quinolina (Compuesto (II),  $R_1 = CH_2OCH_2CH_3$ ,  $n = 4$ ).



(1) Una suspensión de 4-hidroxi-3-nitroquinolina (Gerster y colaboradores, *J Med Chem* **2005**, *48*, 3481) en N,N-dimetil-formamida (0,7 M) se trató por goteo con POCl<sub>3</sub> (1,2 equivalentes), y se agitó a 50°C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se vertió en agua helada, y se extrajo dos veces con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y se concentraron. El producto crudo obtenido se agregó a una solución de 4-amino-butanol (1,3 equivalentes), y trietil-amina (1,9 equivalentes) en EtOH, y se calentó a reflujo durante 15 minutos. Después de la concentración, la cromatografía por evaporación instantánea sobre gel de sílice (elución en gradiente, 2→4 por ciento de MeOH-CHCl<sub>3</sub>) proporcionó la 4-(4-hidroxi-butyl)-amino-3-nitroquinolina como un sólido amarillo en un 97 por ciento de rendimiento.

(2) Una solución del compuesto preparado en (1) anterior, en EtOAc (0,1 M) se hidrogenó en la presencia de Pt/C al 5 por ciento (al 5 por ciento en peso/peso), y MgSO<sub>4</sub> (1,5 equivalentes) a 50 psig (3,5 kg/cm<sup>2</sup>) durante 6 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite y se concentró. El aceite color naranja obtenido se calentó con ácido etoxi-acético (11 equivalentes) a 150°C durante 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió a 0°C, se basificó a un pH de 10 con NH<sub>4</sub>OH concentrado, y se extrajo dos veces con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y se concentraron. La cromatografía por evaporación instantánea sobre gel de sílice (1:60 de MeOH-CHCl<sub>3</sub>) dio el derivado de etoxi-acetato, el cual se trató con NaOH 2,6 M (5,0 equivalentes) en EtOH (0,20 M) a temperatura ambiente durante 1 hora. El etanol se removió bajo presión reducida, y la capa acuosa se extrajo varias veces con AcOEt y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y se concentraron. La cromatografía por evaporación instantánea sobre gel de sílice (elución en gradiente, 1:50→1:15 de MeOH-CHCl<sub>3</sub>) proporcionó la 1-(4-hidroxi-butyl)-1H-imidazo-[4,5-c]-quinolina como un sólido en un 74 por ciento de rendimiento. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 9,29 (s, 1H), 8,25 (dd, 2H), 7,67 (m, 2H), 4,89 (s, 2H), 4,71 (t, 2H), 3,79 (m, 2H), 3,62 (dd, 2H), 2,12 (m, 2H), 1,82 (m, 2H), 1,25 (t, 3H).

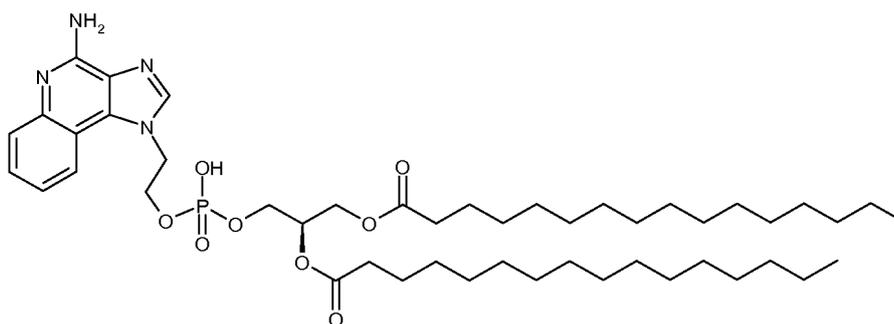
(3) Una solución del compuesto preparado en (2) anterior, y ácido peracético (1,2 equivalentes) en etanol (0,4 M), se calentó a 60°C durante 2,5 horas. Después de la concentración, el producto crudo obtenido se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (elución en gradiente, 1:30→1:6 de MeOH-CHCl<sub>3</sub>), para proporcionar el 5-N-óxido de 1-(4-hidroxi-butyl)-1H-imidazo-[4,5-c]-quinolina como un sólido amarillo en un 94 por ciento de rendimiento.

(4) Una suspensión del compuesto preparado en (3) anterior, en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,43 M) se trató con NH<sub>4</sub>OH (solución acuosa al 30 por ciento, 2,7 mililitros), seguido por cloruro de p-toluen-sulfonilo (1,0 equivalentes) por goteo. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas, y entonces se concentró. La cromatografía por evaporación instantánea sobre gel de sílice (elución en gradiente, 1:30→1:9 de MeOH-CHCl<sub>3</sub>) proporcionó la 4-amino-1-(4-hidroxi-butyl)-1H-imidazo-[4,5-c]-quinolina como un sólido color naranja en un rendimiento cuantitativo.

(5) Una solución del compuesto preparado en (4) anterior, en dioxano (0,12 M) a 50°C, se trató por goteo con HCl 4N en dioxano (1,5 equivalentes), y entonces se dejó enfriar a temperatura ambiente. El precipitado sólido se recolectó, se lavó con dioxano, y se secó para dar la sal de clorhidrato de la 4-amino-1-(4-hidroxi-butyl)-1H-imidazo-[4,5-c]-quinolina en un rendimiento del 89 por ciento: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ 8,13 (d, 1H), 7,97 (d, 1H), 7,65 (t, 1H), 7,55 (t, 1H), 4,89 (bs, 2H), 4,68 (m, 2H), 3,75 (m, 2H), 3,68 (dd, 2H), 2,10 (m, 2H), 1,80 (m, 2H), 1,29 (t, 3H). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) δ 151,9, 148,1, 135,8, 133,7, 130,2, 128,7, 125,8, 125,4, 122,5, 121,2, 118,8, 112,1, 66,8, 64,0, 60,8, 46,8, 28,6, 26,6, 14,5, HRMS calculado para [M+H]<sup>+</sup> 315,1821, encontrado 315,1839.

### Ejemplo 3 (L1)

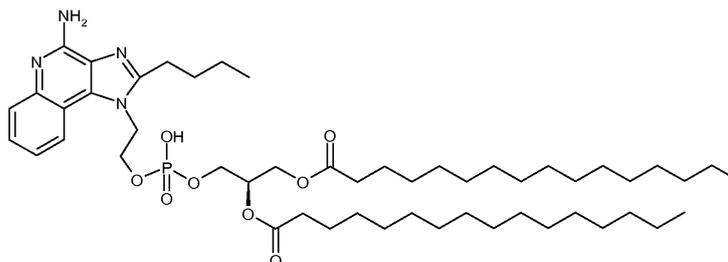
Preparación de 4-amino-1-[2-(1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo)-etil]-1H-imidazo-[4,5-c]-quinolina (Compuesto (I), R<sub>1</sub> = H, Y = W = X = O, n = 2, m = 1, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub> = n-C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>CO).



5 El compuesto **L1** se preparó en un rendimiento del 80 por ciento, siguiendo el procedimiento general descrito en el Ejemplo 1 anterior:  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  8,22 (s, 1H), 8,16 (d, 1H), 7,41 (t, 1H); 7,21 (t, 1H), 6,92 (d, 1H), 5,26 (m, 1H), 4,82 (bs, 2H), 4,67 (bs, 2H), 4,42 (dd, 1H), 4,20 (dd, 1H), 4,05 (t, 2H), 3,14 (q, 1H), 2,31 (m, 4H), 1,59 (m, 4H), 1,25 (m, 48H), 0,88 (m, 6H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz):  $\delta$  173,6, 173,2, 148,1, 145,8, 134,5, 133,9, 129,3, 125,5, 124,5, 118,4, 112,3, 100,3, 77,2, 70,1, 70,0, 63,5, 62,3, 45,9, 34,1, 33,9, 31,7, 29,5, 29,5, 29,3, 29,2, 29,1, 29,1, 28,9, 28,9, 24,7, 24,7, 22,5, 13,9, 8,3. HRMS calculado para  $[\text{M}+\text{H}]^+$  859,5714, encontrado 859,5688.

#### Ejemplo 4 (L2)

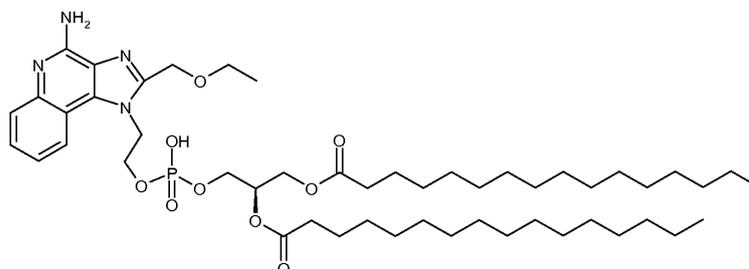
10 Preparación de 4-amino-1-[2-(1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo)-etil]-2-butil-1H-imidazo-[4,5-c]-quinolina (Compuesto I),  $\text{R}_1 = \text{n-C}_4\text{H}_9$ ,  $\text{Y} = \text{W} = \text{X} = \text{O}$ ,  $\text{n} = 2$ ,  $\text{m} = 1$ ,  $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{n-C}_{15}\text{H}_{31}\text{CO}$ .



15 El compuesto **L2** se preparó en un rendimiento del 78 por ciento, siguiendo el procedimiento general descrito en el Ejemplo 1 anterior:  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz):  $\delta$  8,23 (bs, 1H), 7,39 (t, 1H), 7,22 (bs, 1H), 6,93 (bs, 1H), 5,25 (m, 1H), 4,7 (bs, 2H), 4,6 (bs, 2H), 4,42 (dd, 1H), 4,19 (dd, 1H), 4,04 (t, 2H), 3,06 (bs, 2H), 2,32 (m, 4H), 1,96 (p, 2H), 1,59 (m, 6H), 1,26 (m, 48H), 1,07 (t, 3H), 0,88 (m, 6H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz):  $\delta$  173,6, 173,2, 157,2, 147,4, 135,2, 133,6, 128,8, 124,2, 123,6, 120,9, 118,2, 112,2, 77,2, 70,0, 69,9, 63,2, 62,2, 46,3, 33,9, 33,7, 31,6, 29,3, 29,3, 29,3, 29,1, 29,0, 28,95, 28,9, 28,8, 28,7, 28,6, 27,0, 24,5, 24,5, 22,3, 22,1, 13,6, 13,4. HRMS: calculado para  $[\text{M}+\text{H}]^+$  915,6340, encontrado 915,6309.

#### 20 Ejemplo 5 (L3)

Preparación de 4-amino-1-[2-(1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo)-etil]-2etoxi-metil-1H-imidazo-[4,5-c]-quinolina (Compuesto I),  $\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{Y} = \text{W} = \text{X} = \text{O}$ ,  $\text{n} = 2$ ,  $\text{m} = 1$ ,  $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{n-C}_{15}\text{H}_{31}\text{CO}$ .

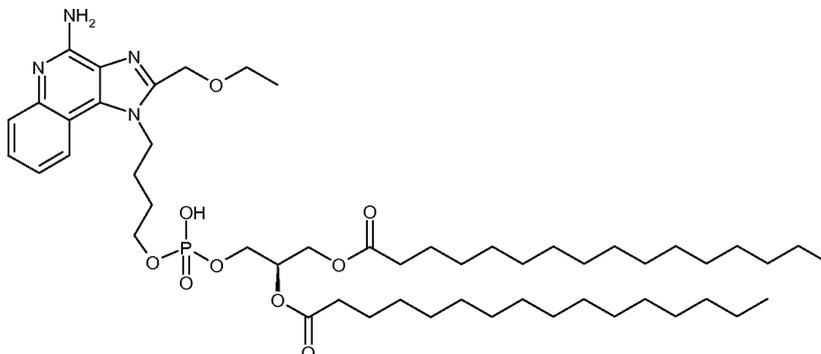


25 El compuesto **L3** se preparó en 80 por ciento de rendimiento siguiendo el procedimiento general descrito en el Ejemplo 1 anterior:  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta$  8,05 (bs, 1H), 7,29 (t, 1H), 7,09 (bs, 1H), 6,78 (bs, 1H), 5,11 (m, 1H), 4,80 (bs, 4H), 4,60 (bs, 2H), 4,28 (dd, 1H), 4,07 (dd, 1H), 3,90 (t, 2H), 3,54 (q, 2H), 2,18 (m, 4H), 1,59 (m, 4H), 1,16 (m, 51H), 0,76 (m, 6H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz):  $\delta$  173,4, 173,0, 153,3, 148,2, 135,7, 134,7, 129,1, 124,4, 124,2, 121,1, 119,1, 112,8, 77,2, 70,2, 70,2, 66,6, 65,4, 64,2, 63,5, 62,5, 57,7, 47,1, 45,7, 34,3, 34,1, 31,9, 29,7, 29,7, 29,6, 29,5, 29,3, 29,3, 29,1, 29,1, 24,9, 22,7, 15,0, 14,1, 8,6. HRMS calculado para  $[\text{M}+\text{H}]^+$  917,6132, encontrado 917,6162.

30

**Ejemplo 6 (L4)**

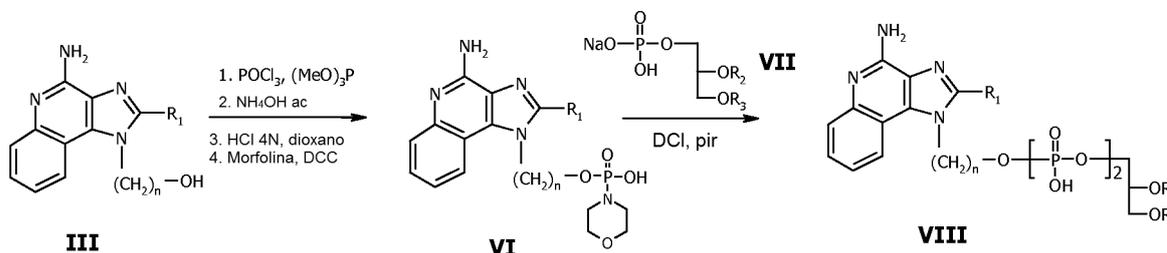
Preparación de 4-amino-1-[2-(1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo)-butil]-2-etoxi-metil-1H-imidazo-[4,5-*c*]-quinolina (Compuesto (I),  $R_1 = H$ ,  $Y = W = X = O$ ,  $n = 4$ ,  $m = 1$ ,  $R_2 = R_3 = n\text{-C}_{15}\text{H}_{31}\text{CO}$ ).



- 5 El compuesto **L4** se preparó en un rendimiento del 26 por ciento, siguiendo el procedimiento general descrito en el Ejemplo 1 anterior:  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  11,2 (bs, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,30 (t, 1H), 7,20 (d, 1H), 6,78 (t, 1H), 6,39 (bs, 1H), 5,28 (m, 1H), 4,79 (s, 2H), 4,43-4,50 (m, 3 H), 4,11-4,27 (m, 5H), 3,67 (dd, 2H), 2,41 (bs, 2H), 2,30 (dd, 4H), 1,96 (bs, 1H), 1,60 (m, 4H), 1,25 (m, 54H), 0,88 (1, 6H);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  173,4, 173,0, 150,9, 148,9, 134,7, 134,2, 128,0, 124,3 (2), 120,5, 118,4, 111,8, 70,3, 70,2, 66,8, 64,7, 64,4, 64,3, 63,4 (2), 62,4, 46,6, 34,2, 34,1, 31,9, 29,6 (3), 29,4, 29,3 (2), 29,2, 29,1, 28,2, 27,4, 24,8 (2), 22,6, 15,1, 14,1. HRMS calculado para  $[\text{M}-\text{H}]^-$  943,6289, encontrado 943,6251.

**EJEMPLO 7**

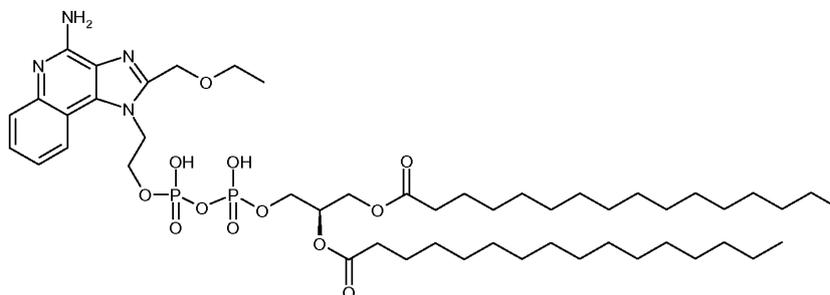
Procedimiento general para la preparación de 4-amino-1-[2-(1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-difosfo)-alquil]-1H-imidazo-[4,5-*c*]-quinolinas (Compuesto (I),  $Y = W = X = O$ ,  $m = 2$ )



- 15 Los diglicéridos de difosfato de imidazoquinolina **VIII** se prepararon mediante el acoplamiento del mono-fosfo-morfolidato de imidazoquinolina **VI**, preparado en una forma cruda a partir de la imidazoquinolina **III**, con la sal sódica de 1,2-diacil-*sn*-glicerol-3-fosfato **VII** de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica (Biochim. Biophys. Acta 1980, 619, 604, J. Biol. Chem., 1990, 265(11), (6112-6117) J. Org. Chem. 1997, 62, 2144-2147) como sigue: Se agregaron  $\text{POCl}_3$  (2,0 equivalentes) y la imidazoquinolina **III** (1,0 equivalentes) a fosfato de trimetilo (0,38 M) a  $0^\circ\text{C}$ . Después de agitar durante 15 horas a  $0^\circ\text{C}$ , la mezcla de reacción se dividió entre  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Et}_2\text{O}$  y las capas se separaron. La capa orgánica se extrajo tres veces con  $\text{H}_2\text{O}$ , y el pH de las capas acuosas combinadas se ajustó a un pH de 9 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  acuoso. La solución acuosa se concentró y se secó bajo un alto vacío, y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice con  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O-Et}_3\text{N}$  (elución en gradiente, 90:10:0,5  $\rightarrow$  60:40:5:1). El producto obtenido se disolvió en dioxano (0,12 M) a  $50^\circ\text{C}$ , y se trató con HCl 4N (1,5 equivalentes). La sal de HCl que se precipitó se recolectó, se enjuagó con dioxano, y se secó bajo un alto vacío. Se agregó morfolina (5,0 equivalentes) a una suspensión de la sal en 1:1 de  $t\text{-BuOH-H}_2\text{O}$  (0,5 M), y la mezcla de reacción se calentó a  $90^\circ\text{C}$ , y se trató con una solución de 1,3-diciclohexil-carbodi-imida (DCC, 5,0 equivalentes) en  $t\text{-BuOH}$  (0,33 M). Después de 1 hora a  $90^\circ\text{C}$ , la mezcla de reacción enfriada se dividió entre  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Et}_2\text{O}$ , y las capas se separaron. La capa orgánica se extrajo dos veces con  $\text{H}_2\text{O}$ , y las capas acuosas combinadas se concentraron y se secaron bajo un alto vacío. Una suspensión del fosfo-morfolidato crudo **VI** obtenido (1,5 equivalentes), y el **VII** (1,0 equivalentes) en un pequeño volumen de piridina se concentró al vacío, y entonces se co-evaporó dos veces con tolueno, y se secó bajo un alto vacío; este procedimiento se repitió dos veces más. Entonces se agregó 4,5-diciano-imidazol (DCI, 3,0 equivalentes) a una suspensión de los sólidos secos en piridina (0,10 M), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 días. La mezcla resultante se concentró, y el residuo obtenido se dividió entre  $\text{H}_2\text{O-CH}_2\text{Cl}_2$ , y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo dos veces con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y las capas orgánicas combinadas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), y se concentraron. La cromatografía sobre gel de sílice con  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  (elución en gradiente, 90:10:0,5  $\rightarrow$  70:30:2) proporcionó el compuesto **VIII** como un sólido incoloro.

**Ejemplo 8 (L5)**

Preparación de 4-amino-1-[2-(1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-difosfo)-etil]-2-etoxi-metil-1*H*-imidazo-[4,5-*c*]-quinolina (Compuesto (I), R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, Y = W = X = O, n = 2, m = 2, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = n-C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>CO).



- 5 El compuesto **L5** se preparó en un rendimiento del 22 por ciento siguiendo el procedimiento general descrito en el Ejemplo 6 anterior: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 8,17 (bs, 1H), 7,10-7,40 (2-3 m, 2-3H), 5,25 (bs, 1H), 4,60-5,00 (bm, 3H), 4,38 (m, 1H), 4,05-4,22 (m, 3H), 3,60-3,82 (m, 4H), 3,41 (bs, 1H), 3,10 (dd, 2H de Et<sub>3</sub>N), 2,28 (m, 4H), 1,84 (dd, 1H), 1,56 (m, 5H), 1,25 (m, 54H), 0,88 (t, 7H); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 173,5, 173,1, 152,4, 147,7, 135,8, 134,2, 128,8, 124,5, 123,6, 122,0, 118,8, 112,2, 77,2, 70,0, 68,1, 66,5, 63,8, 62,4, 54,6, 46,5, 45,5, 38,5, 33,9, 33,0, 29,5, 29,4, 29,1, 28,9, 28,7, 25,0, 24,6, 23,5, 22,7, 22,5, 14,6, 13,8, 13,7, 13,2, 10,7, 8,1. HRMS calculado para [M+H]<sup>+</sup> 997,5796, encontrado 997,5776.

**Ejemplo 9****Prueba *in vivo* de TLR7/8 lipidados**

- 15 Los ligandos de TLR7/8 pueden promover diferentes aspectos de la respuesta inmunitaria en ratones, notoriamente la respuesta de CD8. Se investiga la diferencia en la respuesta entre un ligando de TLR7/8 (el compuesto "núcleo"), y su derivado lipidado correspondiente, empleando técnicas tales como las descritas a continuación.

- 20 La formulación de los compuestos para un estudio de comparación requiere tomar en cuenta los diferentes pesos moleculares de las moléculas de núcleo y lipidadas (por ejemplo, 45 y 4,5 microgramos del compuesto lipidado L3 corresponden a aproximadamente 15 y 1,5 microgramos del compuesto de núcleo correspondiente, "núcleo de L3"), lo cual permite hacer una comparación de los grupos correspondientes del estudio. También se prueban dosis más altas de L3 (200 microgramos) y del núcleo de L3 (150 microgramos). En uno de estos estudios, se utilizan las formulaciones resumidas y descritas más adelante (Tabla 1) para vacunar a los ratones hembras C57BL/6 (H2Kb) de 6 a 8 semanas de edad (10/grupo). Los ratones reciben dos inyecciones con 14 días de separación, y se les extrae la sangre durante las semanas 1, 3 y 4 (para conocer los días precisos en que se extrae sangre, véase la Figura 1). Los ratones se vacunan intramuscularmente. Se utilizan una primera vacuna/refuerzo heterólogo utilizando el adenovirus recombinante que codifica para la proteína SIV-p27 y el p27 con adyuvante como grupos de control, y el adenovirus se inyecta en una dosis de 5 x 10<sup>8</sup> VP. El diseño del estudio está representado en la Figura 1.

**Tabla 1: Resumen de las Formulaciones**

Descripción	p27	QS21	MPL	SB62c <sup>b</sup>	L3	Núcleo de L3
<b>QS/MPL (formulación basada en liposomas)</b>	5	5	5	-	-	-
QS/MPL+ 200µg L3	5	5	5	-	200	-
QS/MPL+ 45µg L3	5	5	5	-	45	-
QS/MPL+ 4,5µg L3	5	5	5	-	4,5	-
QS/MPL+ 150µg núcleo de L3	5	5	5	-	-	150
QS/MPL + 15µg núcleo de L3	5	5	5	-	-	15
QS/MPL + 1,5µg núcleo de L3	5	5	5	-	-	1,5
<b>QS/MPL/SB62C (formulación basada en emulsión)</b>	5	5	-	5 µl		
QS/MPL/SB62C+ 200µg L3	5	5	5	5 µl	200	-
QS/MPL/SB62C+ 45µg L3	5	5	5	5 µl	45	-
QS/MPL/SB62C+ 4,5µg L3	5	5	5	5 µl	4,5	-
QS/MPL/SB62C+ 150µg núcleo de L3	5	5	5	5 µl	-	150
QS/MPL/SB62C + 15µg núcleo de L3	5	5	5	5 µl	-	15

(continuación)

Descripción	p27	QS21	MPL	SB62c <sup>b</sup>	L3	Núcleo de L3
QS/MPL/SB62C + 1,5µg núcleo de L3	5	5	5	5 µl	-	1,5
p27	5	-	-	-	-	-
pura	-	-	-	-	-	-

Todos los compuestos están en µg a menos que se indique lo contrario.  
<sup>b</sup> SB62c contiene el aceite en agua SB62 y colesterol.

5 En el diseño del estudio las moléculas se formulan ya sea en una composición adyuvante basada en liposomas o bien basada en un aceite en agua, la cual contiene los inmunoestimulantes QS21 y MPL. Con el fin de evaluar el valor añadido de TLR7/8L, se comparan las respuestas inmunitarias innatas y adaptables inducidas por las formulaciones que contienen TLR7/8L, QS21 y MPL, con aquélla inducida por las formulaciones que contienen QS21 y MPL correspondientes.

10 La inducción de las respuestas de CD8 y CD4 específicas del antígeno se evalúa mediante la medición de las citocinas intracelulares, 7 días después de la segunda inyección. Los linfocitos de sangre periférica (PBL) se estimulan en la presencia de una reserva de péptidos que abarcan el antígeno p27 entero (péptidos 15-meros, traslape por 11). La secreción de citocinas se bloquea por la Brefeldina A, y se evalúa la presencia de 3 citocinas (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL2) mediante citometría de flujo después del teñido intracelular con los anticuerpos apropiados.

15 Se llevaron a cabo estudios similares al descrito anteriormente utilizando CRX-642 y su contraparte lipidada L3. Las Figuras 2 y 3 muestran la frecuencia de células-T específicas de p27 observada 7 días después de la segunda inmunización. En una forma de respuesta a la dosis, la frecuencia de CD8 específica de p27 aumentó claramente cuando se co-administraron los liposomas que contenían las formulaciones de L3 con MPL y QS-21, comparándose con la formulación de control sin TLR7/8L (Figura 2). Notoriamente, tanto la formulación basada en liposomas como las formulaciones basadas en aceite en agua permitieron tener un aumento en la respuesta de CD8 en la presencia de TLR7/8L lipidados, comparándose con las formulaciones de control correspondientes sin TLR7/8L. Adicionalmente, la capacidad para generar células-T CD8 productoras de citocina dependió de la naturaleza lipidada del ligando de TLR7/8, debido a que la molécula de núcleo de L3, en contraste con L3, no aumentó la respuesta.

20 En complemento a la evaluación de la respuesta de CD8 inducida, se puede evaluar la actividad citotóxica específica del antígeno *in vivo*. Dicho de una manera breve, se inyectan los objetivos impulsados con los péptidos p27 extendiéndose en toda la proteína, y los objetivos no impulsados de control, en los ratones inmunizados y, 24 horas después de la inyección, se evalúa la citotoxicidad específica de p27, por la desaparición del objetivo impulsado.

30 Se llevaron a cabo estudios complementarios de la actividad citotóxica con la evaluación de la respuesta de CD8 inducida del núcleo de L3 y de L3 que se explica anteriormente. Se detectó una actividad citotóxica más alta en los ratones inmunizados con las formulaciones basadas en el ligando TLR7/8 lipidado que en los ratones que recibieron las formulaciones basadas en el ligando TLR7/8 de núcleo (Figura 3). Esta actividad fue más alta que aquélla inducida por las formulaciones de control basadas solamente en QS21 y MPL, en especial cuando se utilizaron dosis altas de TLR7/8L lipidados.

35 Como se muestra para la respuesta de CD8, se incrementó la frecuencia de CD4 específica de p27 cuando se administraron los liposomas que contenían L3 con la formulación que contenía MPL y QS-21 basada en liposomas, comparándose con la formulación de control, dependiendo la respuesta de la dosis de TLR7/8L inyectada (Figura 4). Como para la respuesta de CD8, el núcleo de L3 de la molécula nuclear no fue capaz de inducir una respuesta de CD4 sobre aquélla inducida por las formulaciones de control.

40 Cuando se administraron en una formulación basada en emulsión, el TLR7/8L lipidado también fue capaz de aumentar la respuesta de células-T CD4 sobre el nivel alcanzado por la formulación de control.

45 Cuando están lipidados, el valor añadido de los ligandos de TLR7/8 dentro de diferentes formulaciones se muestra por el aumento de hasta 5 veces en la frecuencia de células-T productoras de citocina (células-T tanto CD8 como CD4). Es interesante que el perfil de citocina de la respuesta de células-T se caracterizó por la alta frecuencia de células-T doblemente positivas (IFN $\gamma$ <sup>+</sup> TNF $\alpha$ <sup>+</sup>).

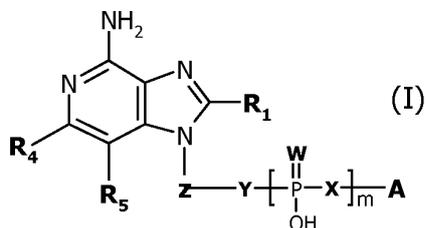
La investigación adicional ilustra la capacidad de los compuestos TLR7/8 lipidados para inducir las quimiocinas y las citocinas pro-inflamatorias innatas entre las cuales se sabe que el IFN tipo I se requiere para la programación de las células-T CD8 puras (sobrevivencia, diferenciación, y desarrollo de memoria). Estas citocinas se miden en el suero de los ratones 3 y 24 horas después de la primera inyección (figuras 5 y 6).

Los resultados de los perfiles de citocina para el núcleo de L3 y para L3 muestran un perfil similar de las citocinas al que se observa entre las formulaciones basadas en liposomas y basadas en emulsión. Se sabe que los ligandos de

5 TLR7/8 inducen el IFN $\alpha$  debido a su capacidad para estimular las células dendríticas plasmacitoides, y realmente se detectó el IFN $\alpha$  en el suero de los ratones inmunizados con L3 de una manera dependiente de la dosis, y en un nivel más alto que para su contraparte nuclear, el núcleo de L3, También se detectó una baja producción de IL-12p70, cercana al nivel del fondo. El nivel de INF $\gamma$  aumentó con una dosis baja de L3, mientras que se mejoraron otras citocinas inflamatorias, tales como TNF $\alpha$  o IL-6 cuando se agregaron tanto el núcleo de L3 como L3 a QS21 y MPL. Las quimiocinas MCP-1 y MIG aumentaron ambas hasta 10 veces con ambos compuestos. Globalmente, estos datos muestran que la molécula lipídada probada es tan efectiva como, si no es que más potente que, las moléculas nucleares correspondientes, para inducir la producción de citocina *in vivo*.

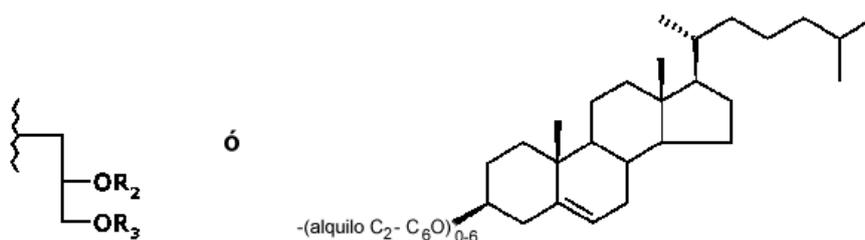
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende la fórmula I:



en la que

- 5 **R<sub>1</sub>** = H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-amino, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-amino, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-amino, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; ramificados o no ramificados, y opcionalmente sustituidos terminalmente con un grupo hidroxilo, amino, tio, hidrazino, hidrazido, azido, acetilenilo, carboxilo, o maleimido,
- 10 **Z** = alquilo o alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, no sustituido o terminalmente sustituido con -(O-alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>1-6</sub>-**Y**=O, NH
- X** = O, CH<sub>2</sub>, CF<sub>2</sub>
- W** = O o S;
- m** = 1-2;
- A** =

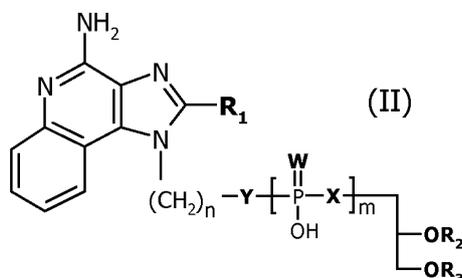


15 en la que

- R<sub>2</sub>** = H, o alquilo C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub> recto/ramificado/insaturado, o acilo;
- R<sub>3</sub>** = alquilo C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub> recto/ramificado/insaturado, o acilo;

- 20 **R<sub>4</sub>**, **R<sub>5</sub>** = independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno, o trifluorometilo; o tomados juntos forman de una manera alternativa un anillo de 6 miembros, heteroarilo que contiene un átomo de nitrógeno, cicloalquilo, o un anillo de heterocicloalquilo que contiene un átomo de nitrógeno; no sustituidos o sustituidos por uno o más de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno, o trifluorometilo o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

2. Un compuesto que tiene la fórmula II



25 en la que

- R<sub>1</sub>** = H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-amino, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-amino, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-amino, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; ramificados o no ramificados, y opcionalmente sustituidos terminalmente con un grupo hidroxilo, amino, tio, hidrazino, hidrazido, azido, acetilenilo, carboxilo, o maleimido;
- 30 **n** = 1-6

**X** = O, CH<sub>2</sub>, CF<sub>2</sub>

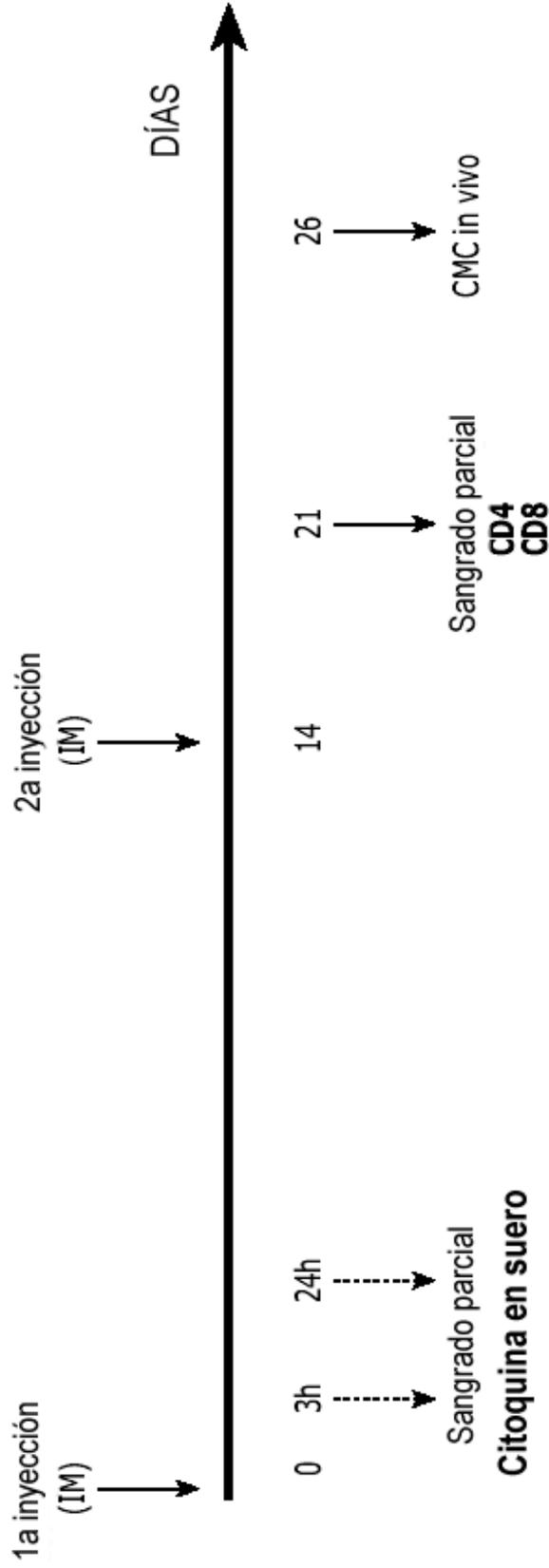
**W** = O o S

**m** = 1-2

**R<sub>2</sub>** = H o alquilo C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub> recto/ramificado/insaturado o acilo

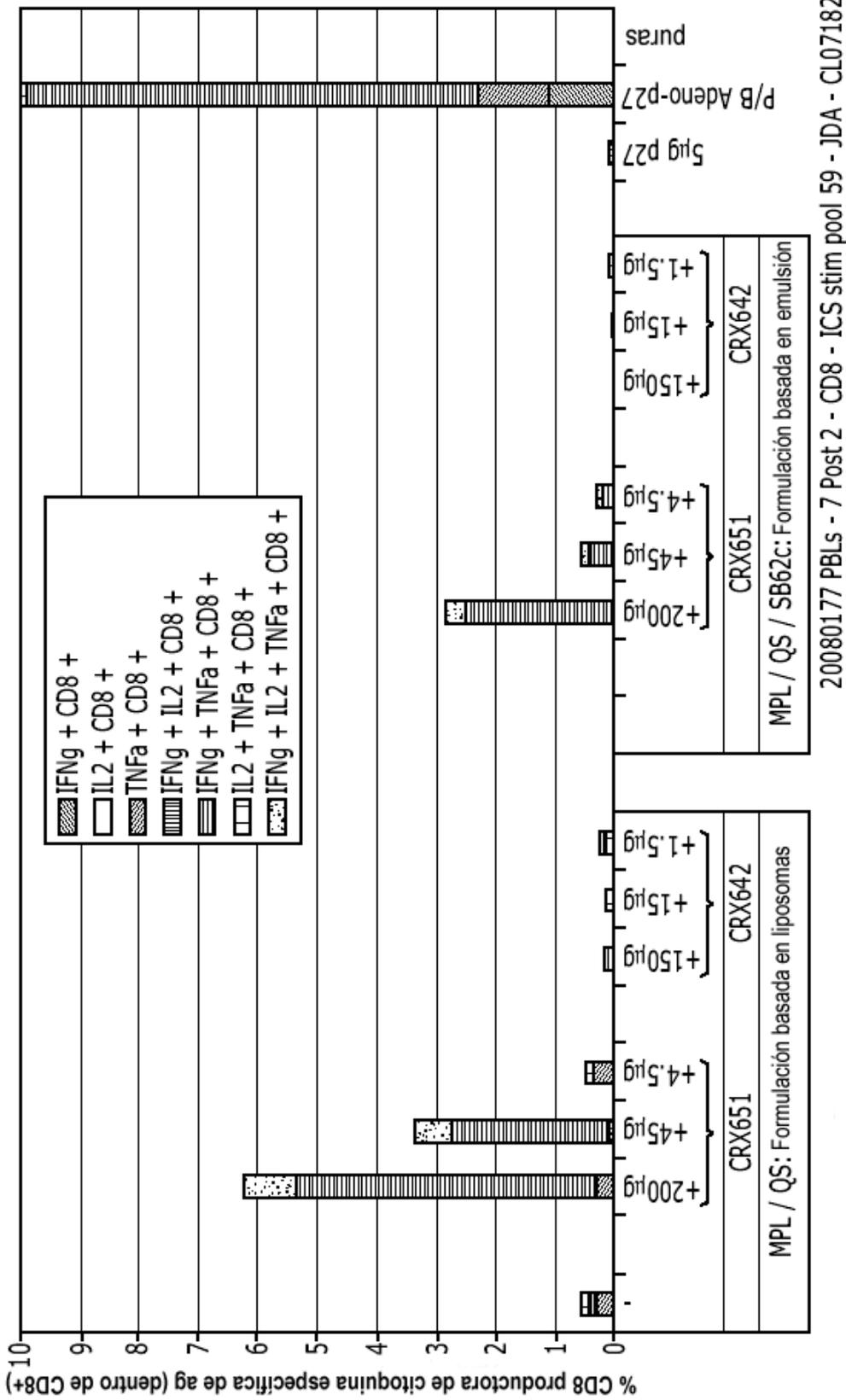
5 **R<sub>3</sub>** = alquilo C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub> recto/ramificado/insaturado o acilo.

3. Un procedimiento para mejorar la actividad adyuvante de una imidazoquinolina que comprende conjugar la imidazoquinolina con un fosfo- o fosfolípido.



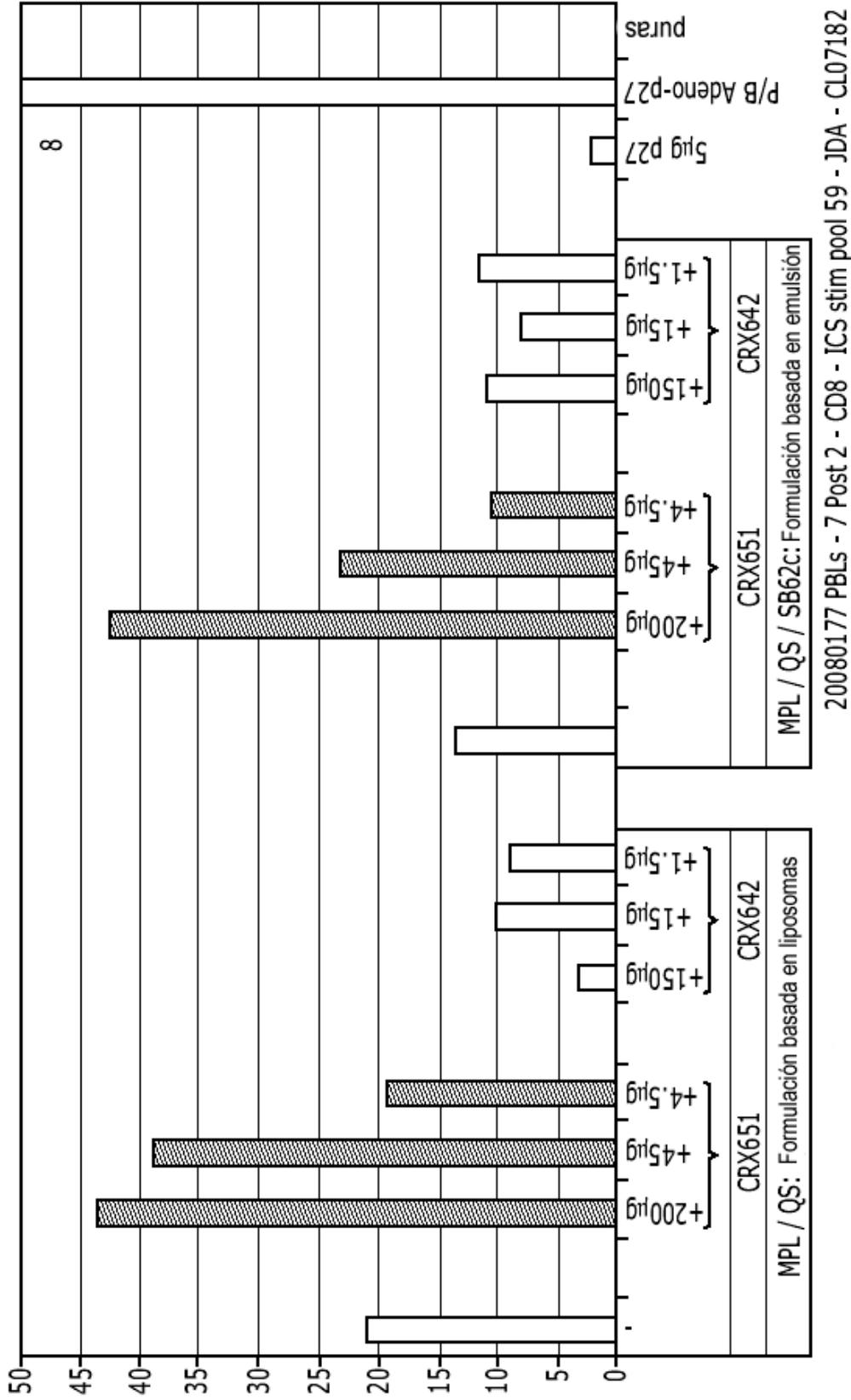
Representación esquemática del diseño del estudio

Figura. 1



Respuesta de CD8 específica de p27

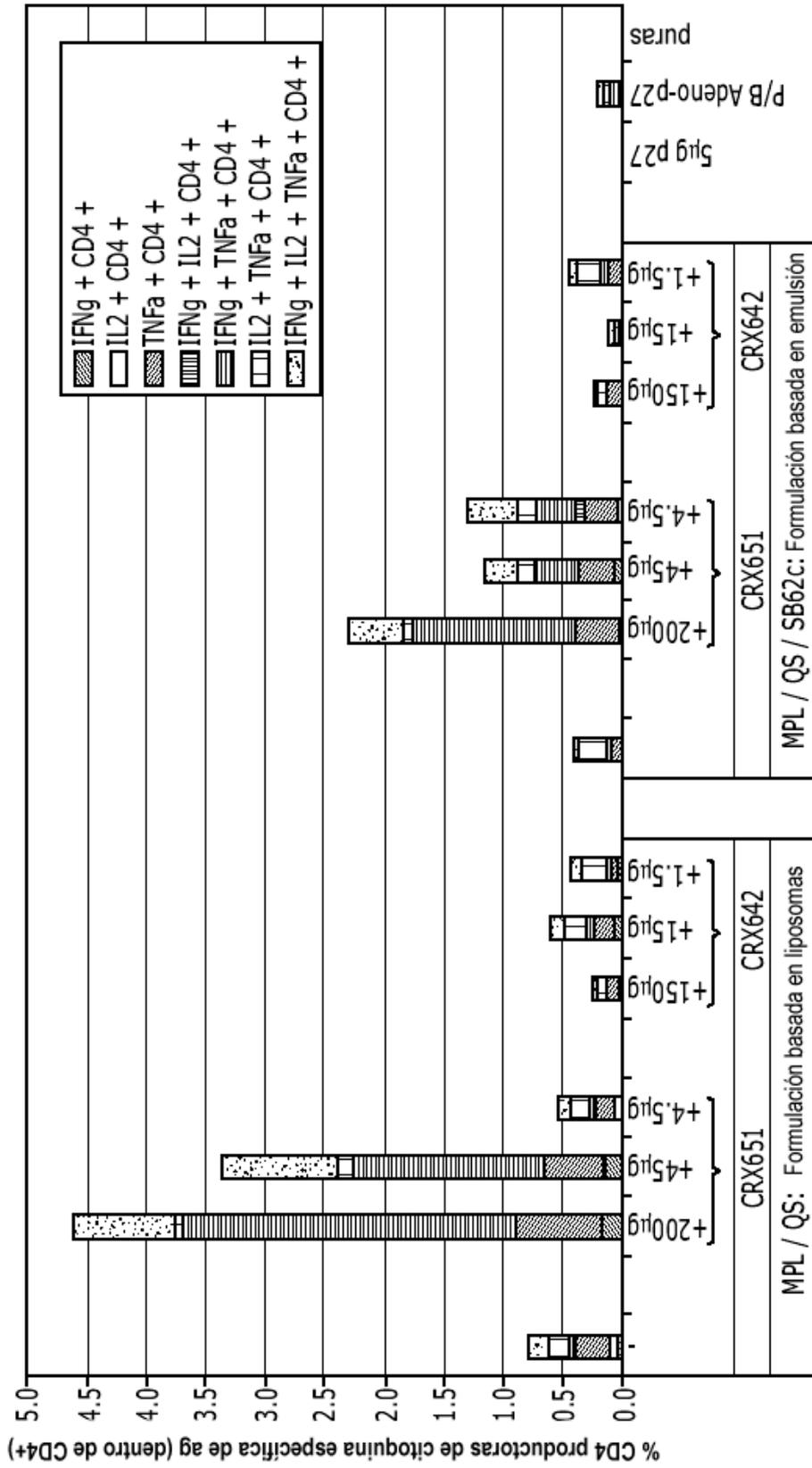
Figura. 2



20080177 PBLs - 7 Post 2 - CD8 - ICS stim pool 59 - JDA - CL07182

Actividad citotóxica específica de p27 detectada in vivo

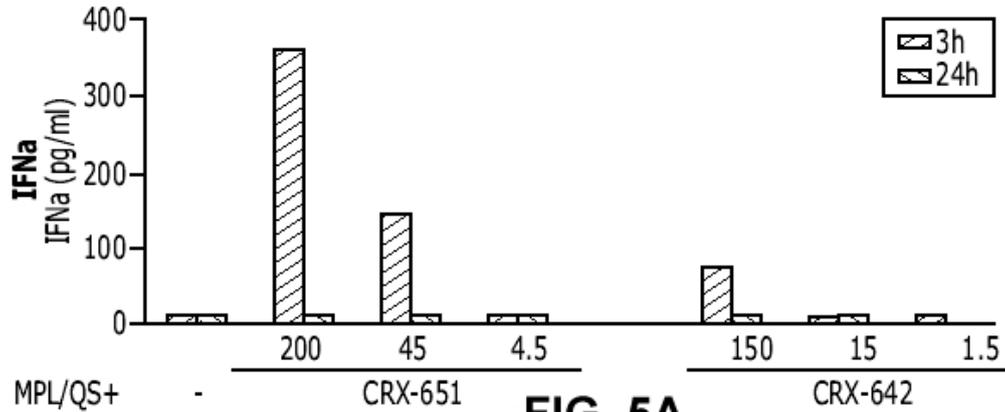
Figura. 3



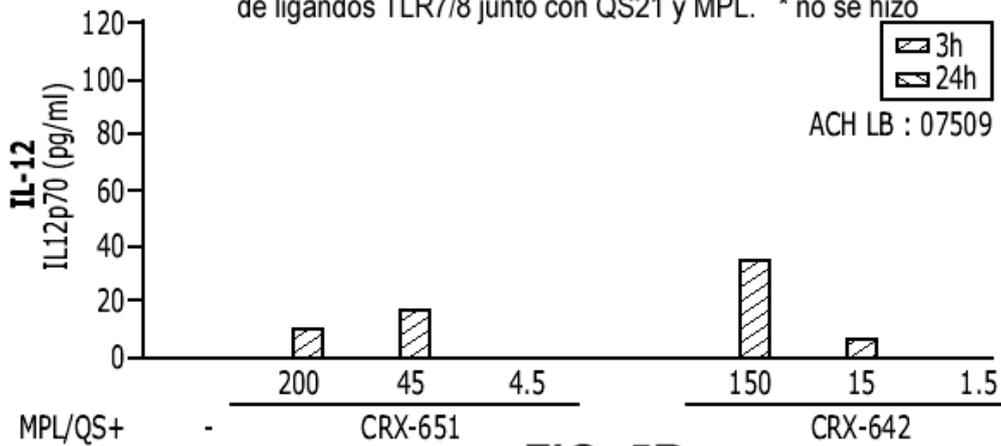
20080177 PBLs - 7 Post 2 - CD4 - ICS stim pool 59 - JDA - CL07182

Respuesta de células-T CD4 específica del antígeno

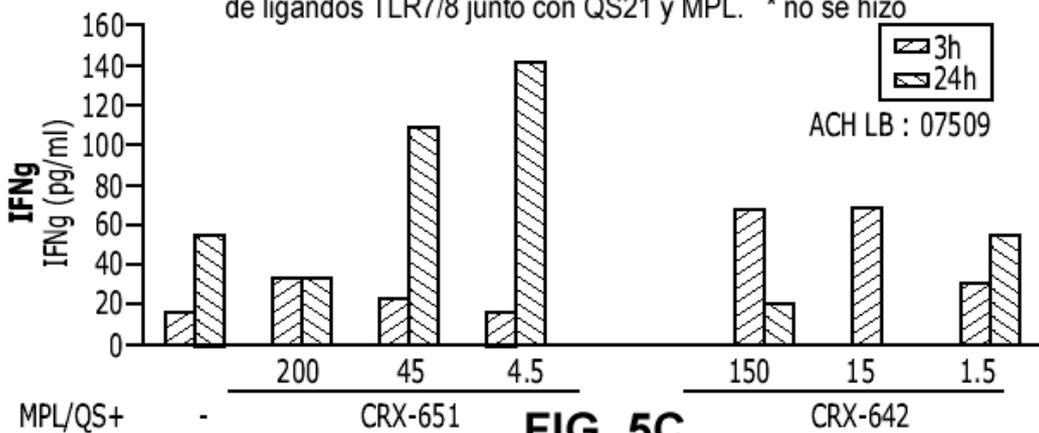
Figura. 4



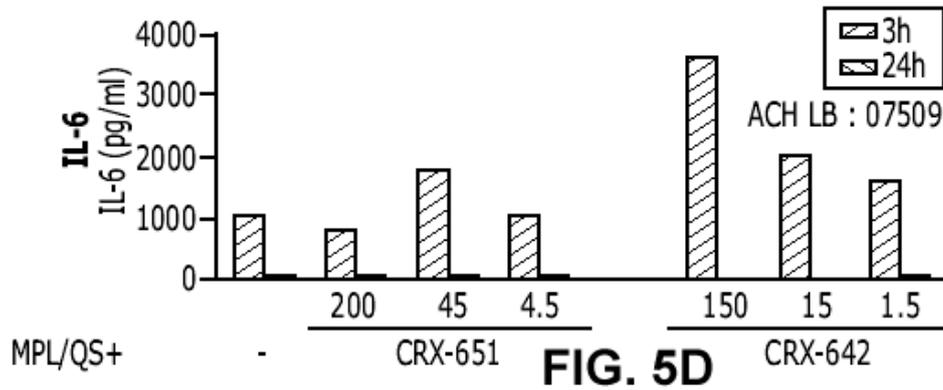
Respuesta de citoquina en suero en los grupos inmunizados con las formulaciones basadas en liposomas sin (-) o con diferentes cantidades de ligandos TLR7/8 junto con QS21 y MPL. \* no se hizo



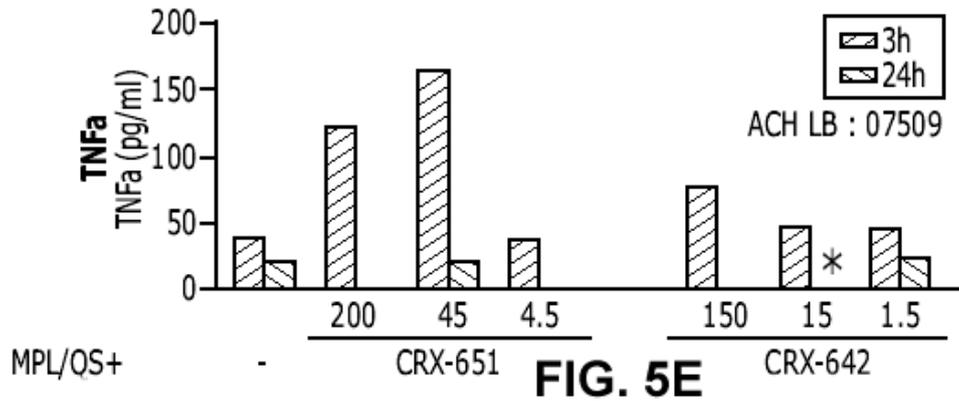
Respuesta de citoquina en suero en los grupos inmunizados con las formulaciones basadas en liposomas sin (-) o con diferentes cantidades de ligandos TLR7/8 junto con QS21 y MPL. \* no se hizo



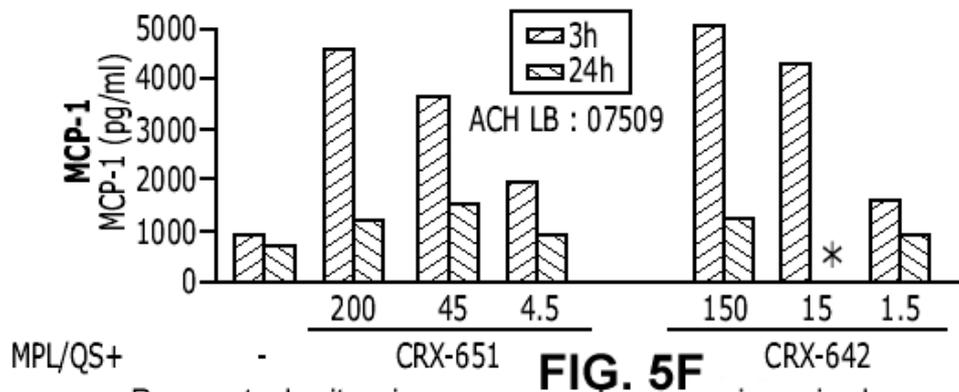
Respuesta de citoquina en suero en los grupos inmunizados con las formulaciones basadas en liposomas sin (-) o con diferentes cantidades de ligandos TLR7/8 junto con QS21 y MPL. \* no se hizo



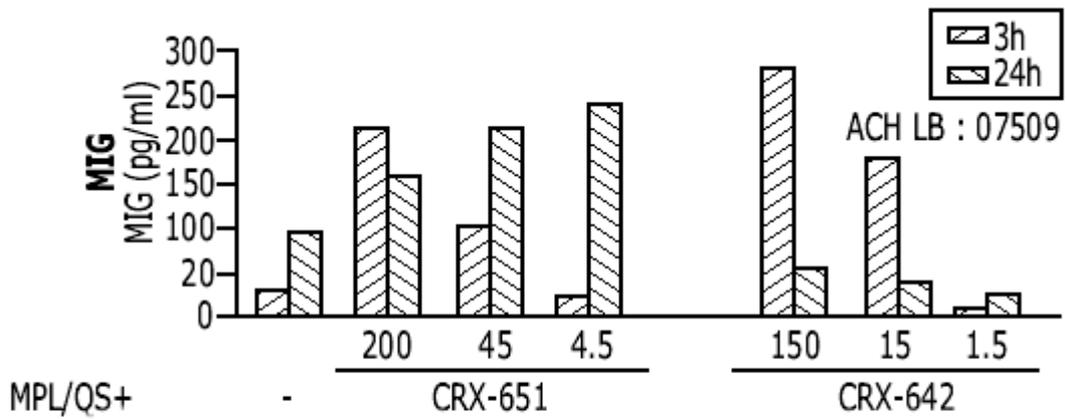
Respuesta de citoquina en suero en los grupos inmunizados con las formulaciones basadas en liposomas sin (-) o con diferentes cantidades de ligandos TLR7/8 junto con QS21 y MPL. \* no se hizo



Respuesta de citoquina en suero en los grupos inmunizados con las formulaciones basadas en liposomas sin (-) o con diferentes cantidades de ligandos TLR7/8 junto con QS21 y MPL. \* no se hizo

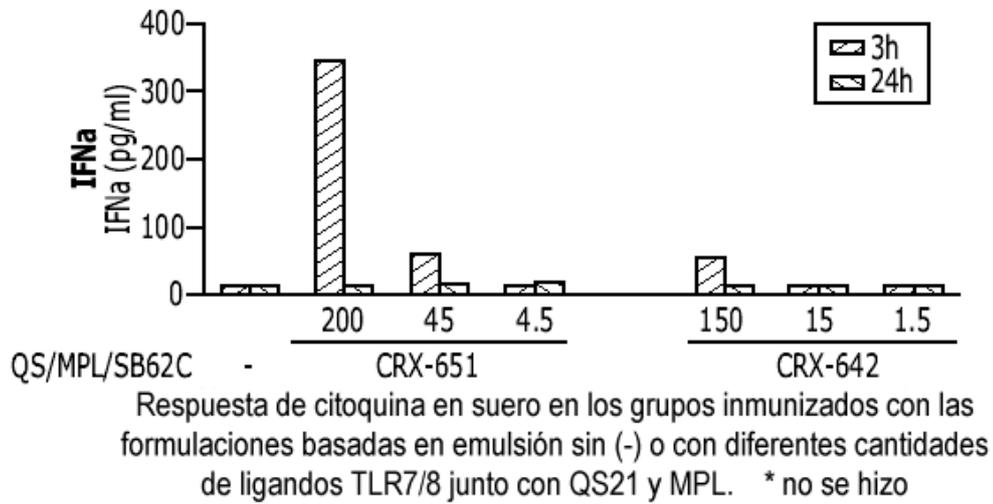


Respuesta de citoquina en suero en los grupos inmunizados con las formulaciones basadas en liposomas sin (-) o con diferentes cantidades de ligandos TLR7/8 junto con QS21 y MPL. \* no se hizo

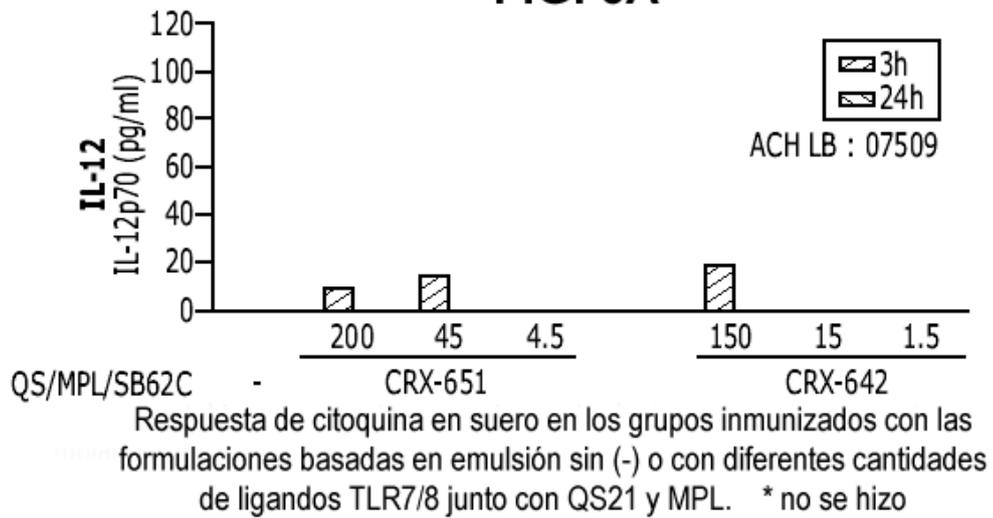


**FIG. 5G**

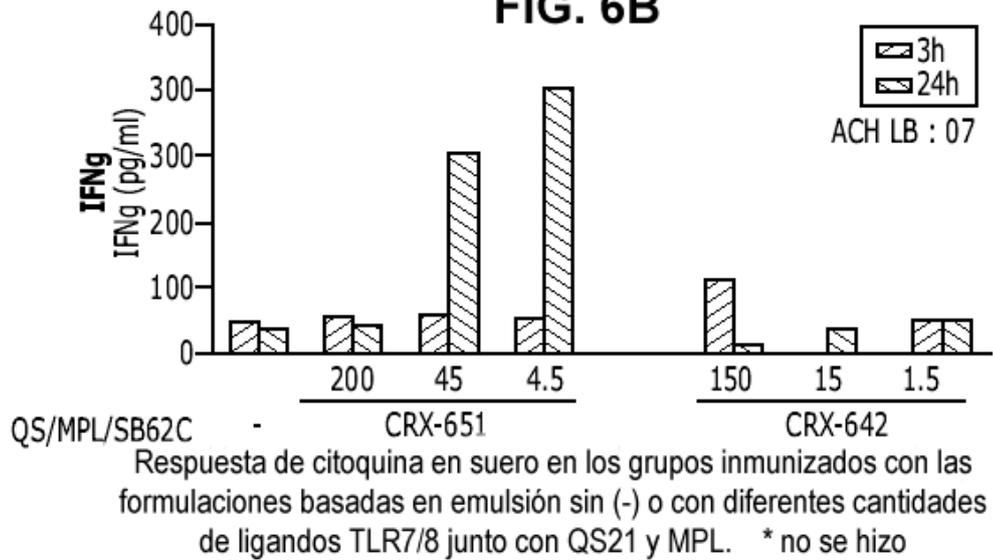
Respuesta de citoquina en suero en los grupos inmunizados con las formulaciones basadas en liposomas sin (-) o con diferentes cantidades de ligandos TLR7/8 junto con QS21 y MPL. \* no se hizo



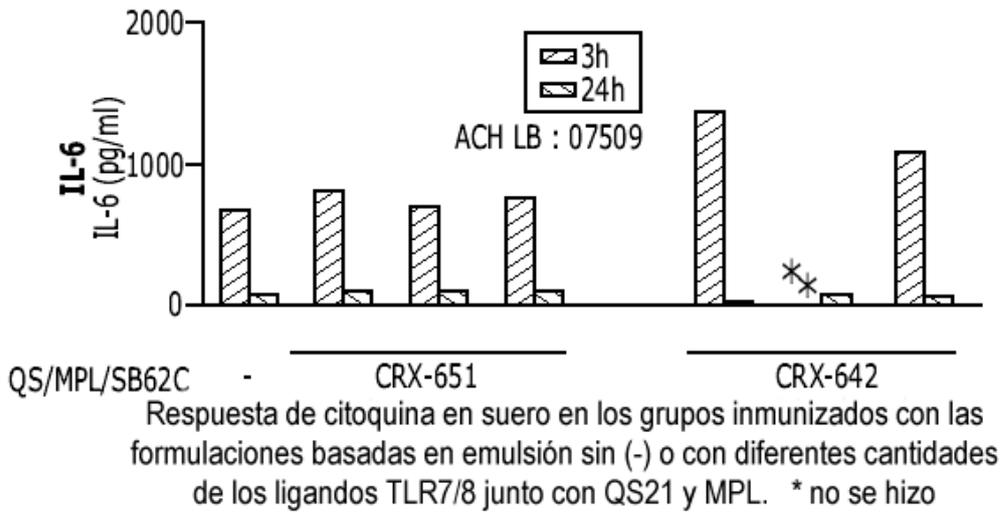
**FIG. 6A**



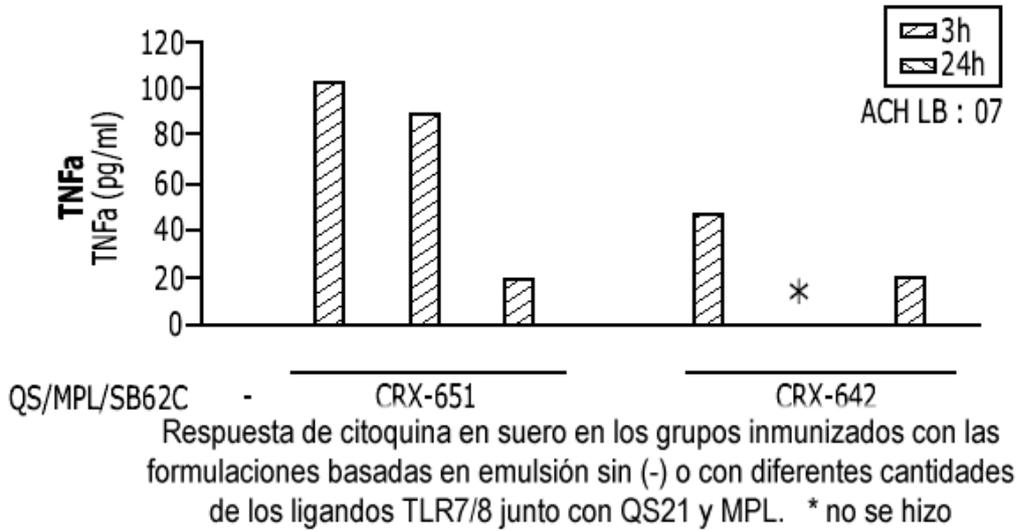
**FIG. 6B**



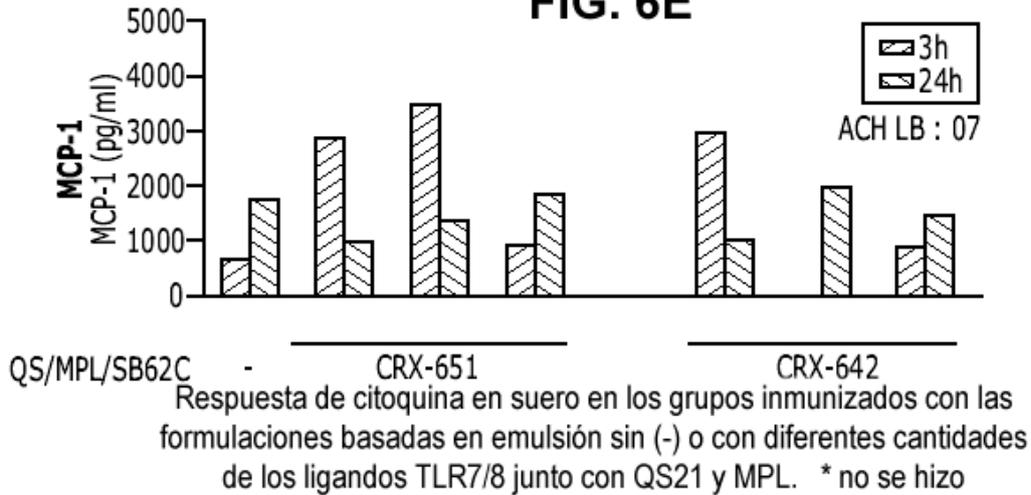
**FIG. 6C**



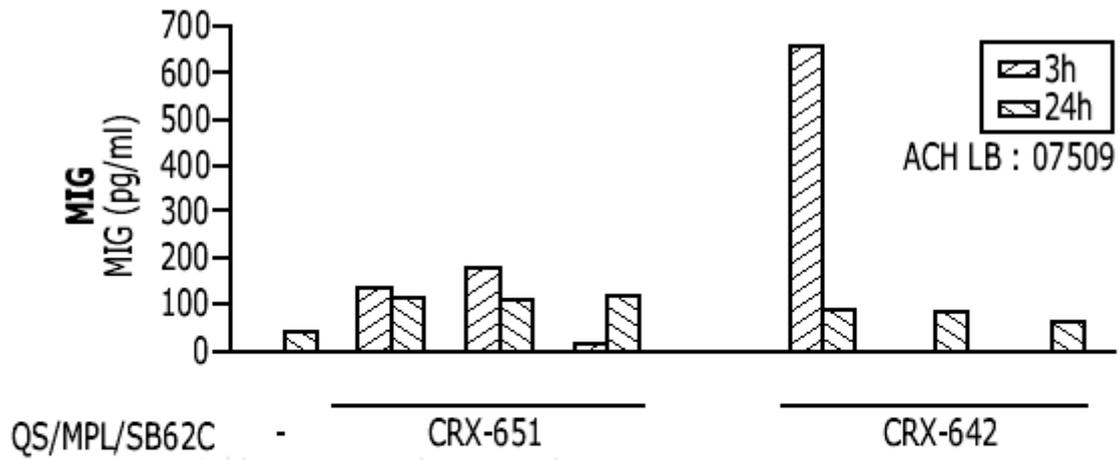
**FIG. 6D**



**FIG. 6E**



**FIG. 6F**



Respuesta de citoquina en suero en los grupos inmunizados con las formulaciones basadas en emulsión sin (-) o con diferentes cantidades de ligandos TLR7/8 junto con QS21 y MPL. \* no se hizo

**FIG. 6G**