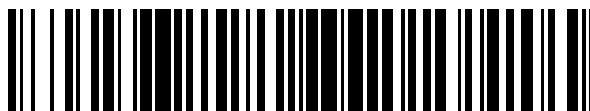


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 999**

51 Int. Cl.:

A61K 31/52 (2006.01)

A61K 31/522 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

C07F 9/6561 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2010** **E 16190246 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019** **EP 3199159**

54 Título: **Derivados de oxoadenina lipídada**

30 Prioridad:

07.08.2009 US 232132 P

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

27.11.2019

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

JOHNSON, DAVID

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 732 999 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 oxoadenina lipídada

Antecedentes de la invención

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

El refinamiento y simplificación de vacunas microbianas y el uso de antígenos subunitarios sintéticos y recombinantes para mejorar la capacidad de fabricación y seguridad de las vacunas ha dado como resultado una disminución en la potencia de las vacunas. Esto ha conducido a estudios sobre la administración secundaria de adyuvantes con antígenos para potenciar la actividad de las vacunas y la débil inmunogenicidad de epítomos sintéticos y recombinantes. Los adyuvantes son aditivos que potencian las respuestas inmunohumorales y/o mediadas por células hacia un antígeno de vacuna. El diseño de adyuvantes de vacunas, sin embargo, ha sido históricamente difícil debido a la naturaleza compleja de los mecanismos moleculares implicados en la función del sistema inmunitario. Aunque la adición de componentes microbianos se conoce desde hace mucho para potenciar las respuestas inmunoadaptativas, solo recientemente se mostró que los receptores de tipo toll (TLR) sobre las células implicadas en la supervivencia inmunitaria, tal como las células epiteliales y dendríticas, encajan muchos de estos productos microbianos mediante los "modelos asociados a patógenos" así denominados o PAMP. Muchos adyuvantes de vacunas e inmunomoduladores independientes parecen interactuar con miembros de la familia TLR.

De los 10 TLR conocidos que se han identificado en seres humanos, cinco está asociados con el reconocimiento de componentes bacterianos (TLT 1, 2, 4, 5, 6) y otros cuatro (TLR 3, 7, 8, 9) parecen restringirse a compartimentos citoplásmicos y están implicados en la detección del ARN vírico (TLR 3, 7, 8) y ADN sin metilar (TLR9) (Iwasaki, A., Nat Immunol 2004, 5, 987) La activación de los TLR regula las rutas de señalización intracelulares y conduce a la expresión génica mediante la interacción con moléculas adaptadoras intracelulares tal 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 citoquinas/quimioquinas inflamatorias y los interferones de tipo I (IFN α/β), que puede conducir a la potenciación preferente de las respuestas inmunitarias mediadas humorales y mediadas por células específicas de antígenos (Zughaier, S. Infect Immun 2005, 73, 2940). La inmunidad humoral es la línea principal de defensa contra patógenos bacterianos, mientras que la inducción de los linfocitos T citotóxicos (LTC) parece ser crucial para la inmunidad protectora en el caso de la enfermedad vírica y el cáncer.

En el caso de la activación de TLR7 y TLR8, Se han identificado unas pocas diferentes clases de miméticos de moléculas pequeñas de los ligandos del ARNm víricos naturales (rico en U y/o G). Estos incluyen determinados compuestos antivíricos relacionados con los metabolitos de guanosina oxidados (oxoguanosinas), que interactúan principalmente con TLR7 (Heil, F. Eur J Immunol 2003, 33, 2987; Hemmi, 2002) y los derivados de adenina que encajan TLR7 y/o TLR8. La capacidad de estimulación inmunitaria de estos compuestos se ha atribuido a las rutas de señalización dependientes de TLR/MyD88 y la producción de citoquinas, incluyendo IL6 y los interferones de tipo I y II (particularmente interferón- α). la activación de TLR7 o TLR8 conduce a la regulación en exceso de moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD-40, CD-80, CD-86) y moléculas MHC de clase I y II en células dendríticas (DC). Las DC son las células principales del sistema inmunitario implicadas en la captación y presentación de los antígenos a los linfocitos T. células dendríticas plasmacitoides (pDC), que expresan preferentemente TLR7, son células productoras de interferón- α profesionales; mientras que las mDC expresan solo TLR8. La activación de TLR8 sobre las mDC conduce a la producción preferente de citoquinas proinflamatorias tales como IL-12, TNF - α , e IFN- γ e inmunidad mediada por células (CMI). Se ha mostrado que los agonistas de TLR7 son más eficaces en la generación de IFN- α y las citoquinas reguladas por IFN, mientras que los agonistas de TLR8, que conduce a la inversión de la función de las células reguladoras (Treg) CD4+, son más eficaces en la inducción de citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α 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 debe inducir CMI p las respuestas inmunitarias de tipo Th1 (Gordon J Immunol 2005, 1259).

Una clase de derivados de adenina activos para TLR que ha recibido una considerable cantidad de atención son las oxoadeninas. Las oxoadeninas contienen normalmente un grupo hidroxilo en la posición 8 del anillo de adenina (que se muestra a menudo en la forma tautómera 8-ceto/oxo), diversos sustituyentes en las posiciones 2 y 9, y un grupo amino aromático sin sustituir en la posición 4. Como con otros derivados de adenina inductores de IFN tales como las imidazoquinolinas, se piensa que un grupo amino aromático sin sustituir es esencial para la actividad inductora de IFN. Muchas de las oxoadeninas, que se desarrollaron inicialmente para superar determinados efectos secundarios asociados con las imidazoquinolinas, ha mostrado ser considerablemente más potente que las imidazoquinolinas prototípicas tales como imiquimod y resiquimod con respecto a la actividad inductora de IFN *in vitro* e *in vivo* pero desprovista de actividad emética, un efecto secundario clínico principal con las imidazoquinolinas. Por ejemplo, la oxoadenina SM360320 está actualmente bajo desarrollo preclínico contra el VHC y ha mostrado suprimir la replicación del VHC en hepatocitos humanos mediante la inducción de IFN de tipo I así como a través de un mecanismo independiente de IFN (Lee PNAS 2006, 103, 1828). Sin embargo, a pesar del hecho de que la clase oxoadenina parece presentar mejores perfiles de toxicidad/bioactividad globales que las imidazoquinolinas, la

administración de SM360320 a ratones mediante diversas rutas conduce a una respuesta sistémica a la enfermedad, mediada en parte por las citoquinas inflamatorias liberadas por mastocitos (Hayashi Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2008, 295, R123). De hecho, la gran "huella" inmunológica de los agonistas de TLR7 en general ha conducido a riesgos sobre la toxicidad y a la suspensión de ensayos clínicos en muchos casos (Strominger Brain Res Bull 2001, 55, 445; Schmidt Nat Biotech 2007, 25, 825).

Debido a que la mayoría de los agonistas de TLR7/8 actualmente bajo desarrollo a menudo presentan propiedades tóxicas, son inestables, y/o tienen efectos inmunoestimuladores insustanciales, el descubrimiento y desarrollo de los adyuvantes de vacunas eficaces y seguros que activan TLR7 y/o TLR8 es esencial para mejorar la seguridad y eficacia de las vacunas existentes y nuevas.

Breve descripción de la invención

En el presente documentos, los inventores describen novedosas oxoadeninas lipidadas que comprenden una molécula de oxoadenina sustituida con un heterociclo unida a un fosfolípido o fosfonolípido de tal manera que facilite la captación en las células inmunitarias y potenciar la activación de TLR7/8 endosómico y la presentación del antígeno cuando se administra solo o en una formulación de depósito con un antígeno. Las respuestas inmunitarias potenciadas con compuestos de la invención sujeto son posiblemente debidas a la interacción directa de los compuestos de fórmula (I) con TLR7 y/o TLR8 endosómicos u otros receptores moleculares y/o la interacción de un metabolito activo tras la acción enzimática con TLR7 y/o TLR8 u otros receptores moleculares.

Los compuestos de la invención han mostrado ser inductores del interferón- α y otras citoquinas inmunoestimuladoras y puede poseer un perfil de la toxicidad de la actividad mejorado en comparación con los inductores de citoquinas conocidos cuando se usan como adyuvantes para los antígenos de vacunas en el tratamiento terapéutico o profiláctico de las enfermedades infecciosas y el cáncer. Estos compuestos son novedosos por sí mismos.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

A lo largo de esta solicitud, se hacen referencia a diversas realizaciones que se refieren a los compuestos, composiciones y procedimientos. Las diversas realizaciones descritas se entiende que proporcionan una variedad de ejemplos ilustrativos y no deben considerarse como descripciones de especies alternativas. Más bien debe señalarse que las descripciones de las diversas realizaciones proporcionadas en el presente documento pueden ser de puntuación solapante. Las realizaciones descritas en el presente documento son meramente ilustrativas y no se entiende que limiten el alcance de la presente invención.

Debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir solo realizaciones particulares y no se desea que sea limitante. A lo largo de esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a numerosos términos que deben definirse que tienen los siguientes significados.

"Alquilo" se refiere a grupos hidrocarbilo alifáticos saturados monovalentes que tienen de 1 a 14 átomos de carbono y, en algunas realizaciones, de 1 a 6 átomos de carbono. "alquilo (C_x-C_y)" se refiere a grupos alquilo que tienen de x a y átomos de carbono. Este término incluye, a modo de ejemplo, grupos hidrocarbilo lineales y ramificados tales como metilo (CH_3-), etilo (CH_3CH_2-), n-propilo ($CH_3CH_2CH_2-$), isopropilo ($(CH_3)_2CH-$), n-butilo ($CH_3CH_2CH_2CH_2-$), isobutilo ($(CH_3)_2CHCH_2-$), sec-butilo ($(CH_3)(CH_3CH_2)CH-$), t-butilo ($(CH_3)_3C-$), n-pentilo ($CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2-$), y neopentilo ($(CH_3)_3CCH_2-$).

"Alcoxi" se refiere al grupo -O-alquilo, en el que alquilo se define en el presente documento. Alcoxi incluye, a modo de ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, t-butoxi, sec-butoxi, y n-pentoxi.

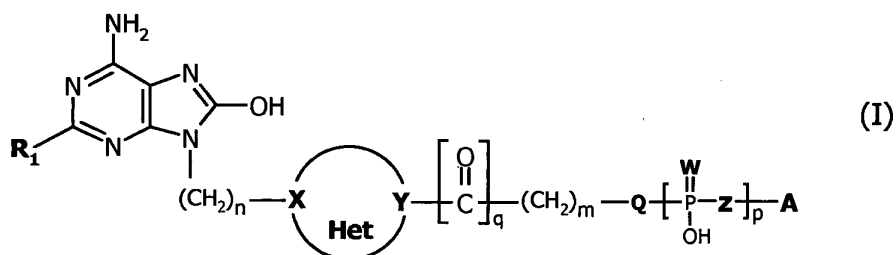
"Acilo" se refiere a los grupos $H-C(O)-$, alquilo- $C(O)-$ y alquenilo- $C(O)-$.

"Amino" se refiere al grupo $-NHR^4$ donde R^4 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, cicloalquilo, heteroarilo y heterocíclico.

"Cicloalquilo" se refiere a un grupo cíclico saturado o parcialmente saturado de entre 3 a 14 átomos de carbono y sin heteroátomos en el anillo.

Salvo que se indique otra cosa, a la nomenclatura de los sustituyentes que no se definen explícitamente en el presente documento se llega nombrando la porción terminal de la funcionalidad seguido por la funcionalidad adyacente hacia el punto de unión. Por ejemplo, el sustituyente "arilalquiloxicarbonilo" se refiere al grupo (aril)-(alquil)-O-C(O)-. Se entiende que las anteriores definiciones no se pretende que incluyan patrones de sustitución inadmisibles (por ejemplo, metilo sustituido con 5 grupos flúor). Dichos patrones de sustitución inadmisibles son bien conocidos por el técnico experto.

Los compuestos de la invención sujeto son moléculas adyuvantes que comprende una molécula de oxoadenina sustituida con un heterociclilo de nitrógeno unida covalentemente a un grupo fosfolípido o fosfonolípido. Los compuestos de la invención sujeto están comprendidos generalmente por la Fórmula (I):



en la que

R₁ = alquilo C₁₋₆, alquilamino C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, cicloalquil C₃₋₆alquilo C₁₋₆, cicloalquil C₃₋₆alquilamino C₁₋₆, cicloalquil C₃₋₆alcoxi C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆alquilamino C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆alcoxi C₁₋₆; y de forma opcional, terminalmente sustituido con un grupo hidroxilo, amino, tio, hidrazino, hidrazido, azido, acetilenilo, carboxilo, o maleimido;

n = 0-6;

Het es un heterociclo de nitrógeno saturado de cuatro, cinco, o seis miembros en el que

X, Y = CH o N, y al menos uno de **X** e **Y** es un átomo de nitrógeno;

Q = O, NH, o un enlace covalente;

Z = O, CH₂, CF₂ o un enlace covalente;

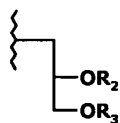
W = O, S;

m = 0-6;

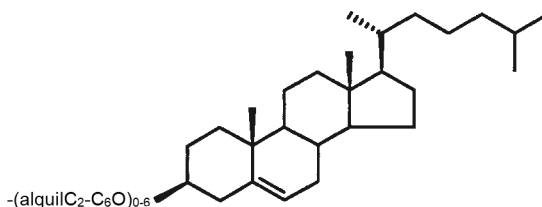
p = 1 o 2;

q = 0 o 1;

A =



o



en la que

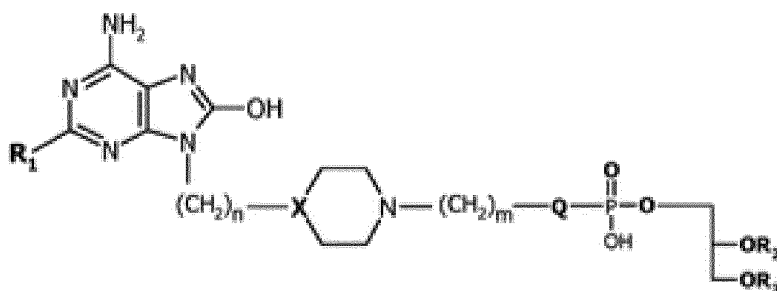
R₂ = H o alquilo o acilo C₄-C₂₄ saturado o insaturado;

R₃ = alquilo o acilo C₄-C₂₄ saturado o insaturado;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los compuestos de la invención sujeto se definen generalmente por la Fórmula (IX):

(IX)



R_1 es alcoxi C_{1-6} o alcoxi C_{1-6} alquilo C_{1-6}

n es 0 o un entero entre 1-2;

X es CH o N;

Q es O, NH

m es 0 o un entero entre 1-2;

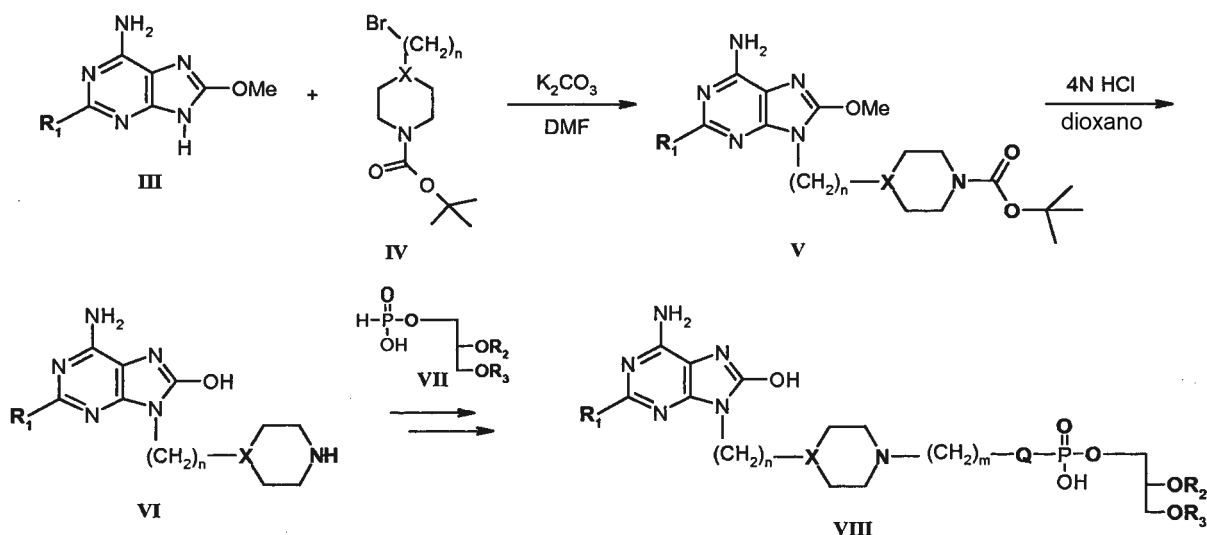
R_2 es H un alquilo o acilo C_4-C_{24} lineal, ramificado, o insaturado, y

R_3 es un alquilo o acilo C_4-C_{24} lineal, ramificado o insaturado;

o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los compuestos de la invención sujeto se preparan a partir de intermedios de oxoadenina conocidos **III** como se muestra en una realización en el Esquema 1 mediante (1) alquilación de **III** con un bromuro de alquilo de un heterociclos de nitrógeno protegido adecuado **IV**, (2) la desprotección simultánea de los grupos protectores de N y O de **V** en condiciones ácidas, y (3) cualquier fosfatidilación directa del sustituyente N-heterocíclico de **VI** ($m = 0$, $Q =$ enlace único) con **VII** proporciona compuestos de la invención sujeto **VIII** en los que $m = 0$ y $Q =$ enlace único; o, como alternativa, la N-alquilación de **VI** con un bromuro de amino o hidroxialquilo protegido con N u O seguido por la desprotección y la O- o N-fosfatidilación con **VII** para dar los compuestos de la invención sujeto **VIII** en los que $m = 2-6$ y $Q = O$ o NH.

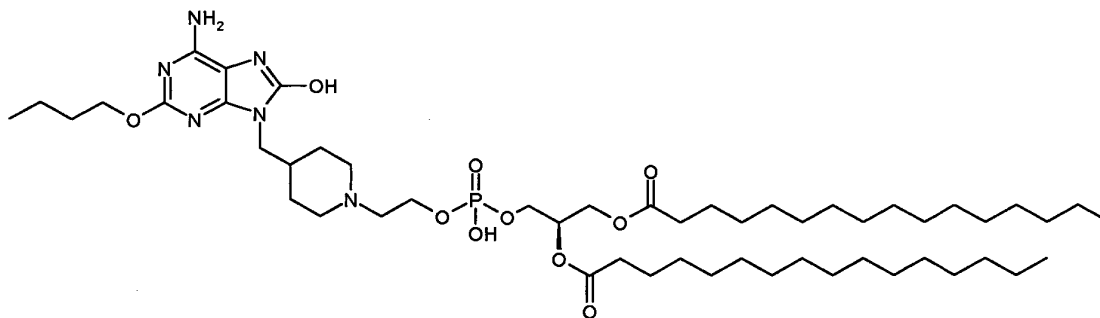
Esquema 1



En otro aspecto adicional, la invención comprende un compuesto de acuerdo con la estructura de la Fórmula IX, en la que X es CH.

Ejemplo 1 (Compuesto A1)

Preparación de la 6-Amino-2-butoxi-9-[N-(2-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo)etil)-4-piperidinilmetil]-8-hidroxipurina (Compuesto (II), $R_1=n$ -butoxi, $n=1$, $X=CH$, $Q=O$, $Z=O$, $W=O$, $m=2$, $p=1$, $R_1=R_2=n$ - $C_{15}H_{31}CO$)



(1) Se añadió carbonato de potasio (0,65 g) a una solución de 6-amino-2-butoxi-8-metoxipurina (0,55 g) en N,N-dimetilformamida seca (DMF, 5,5 ml) y la mezcla de reacción resultante se calentó a 60 °C durante 1 h. Se

añadió 4-(Bromometil)-1-piperidinecarboxilato de 1,1-dimetiletilo (0,5 g) utilizando DMF adicional (1,5 ml) para transferir el bromuro residual y la mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 3 h. Después de 16 h a temperatura ambiente, se continuó el calentamiento a 50 °C durante otras 5 h hasta completar la reacción. A continuación se añadió agua, y la mezcla resultante se extrajo tres veces con acetato de etilo (EtOAc). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua, se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron. La cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con $\text{MeOH}-\text{CHCl}_3$ (gradiente de elución; 1:99→2,5:97,5) dio como resultado 0,64 g (94 %) de 4-[6-amino-2-butoxi-8-metoxi-purin-9-il]metil-1-piperidinecarboxilato de 1,1-dimetiletilo como un sólido de color amarillo. RMN ^1H (CDCl_3): δ 5,14 (s, 2H), 4,27 (t, 2H), 4,11 (s, 3H), 3,81 (d, 2H), 2,65 (m, 2H), 2,03 (m, 1H), 1,77 (p, 3H), 1,57-1,45 (m, 14H), 1,26-1,17 (m, 2H), 0,97 (t, 3H).

(2) A una solución del compuesto preparado en (1) anteriormente (0,63 g) en MeOH (16 ml) se añadió HCl 4,0 M en dioxano (5,3 ml). Tras agitar 4,5 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró y se secó a alto vacío. La cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con $\text{CHCl}_3-\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ (gradiente de elución; 90:10:1→75:25:1) dio como resultado 0,404 g (85 %) de clorhidrato de 6-amino-2-butoxi-9-(4-piperidinilmetil)-8-hidroxipurina como un sólido de color blanco. RMN ^1H (CDCl_3): δ 4,84 (s, 5H), 4,27 (t, 2H), 3,79 (d, 2H), 3,40 (d, 2H), 2,96 (t, 2H), 2,21 (m, 1H), 1,92 (d, 2H), 1,75 (m, 2H), 1,60-1,47 (m, 4H), 1,00 (t, 3H).

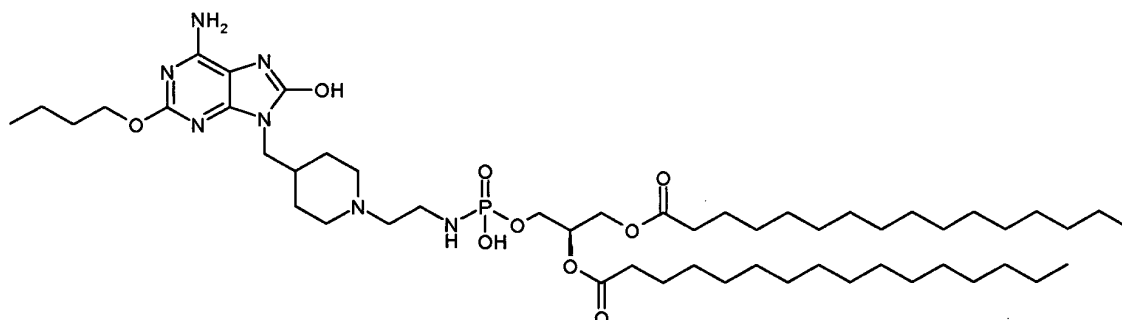
(3) A una solución del compuesto preparado en (2) anteriormente (1,24 g) en DMF (12,6 ml; 0,25 M) se añadió K_2CO_3 (1,74 g). La mezcla resultante se calentó a 60 °C durante 1 h, se trató con 2-bromoetoxi-*tert*-butildimetilsilano (0,81 ml), y a continuación se calentó a 50 °C durante 18 h. La mezcla de reacción enfriada se inactivó con agua, se transfirió a un embudo separador, y se extrajo tres veces con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron. La cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice dio como resultado 1,25 g (83 %) de 6-amino-2-butoxi-9-[N-(2-O-*tert*-butildimetilsilil)etil]-4-piperidinilmetil]-8-hidroxipurina como un sólido blanquecino. RMN ($\text{CDCl}_3-\text{CD}_3\text{OD}$, 400 MHz): δ 4,26 (m, 4H), 3,75 (m, 4H), 3,36 (m, 2H), 2,96 (m, 2H), 2,54 (t, 2H), 1,92 (a s, 1H), 1,73 (m, 2H), 1,66 (m, 2H), 1,40-1,51 (m, 5H), 0,98 (t, 3H), 0,89 (m, 9H), 0,06 (s, 6H).

(4) A una solución del compuesto preparado en (3) anteriormente (2,74 g) en MeOH (41 ml) se añadió HCl 4,0 M en dioxano (5,7 ml). Tras agitar 0,5 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró y se secó a alto vacío. La cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con $\text{CHCl}_3-\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ (gradiente de elución; 90:10:1→75:25:1) dio como resultados 2,29 g (100 %) de clorhidrato de 6-amino-2-butoxi-9-[N-(2-hidroxi)etil]-4-piperidinilmetil]-8-hidroxipurina como un sólido de color blanco. RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz): δ 4,53 (t, 2H), 3,87 (m, 4H), 3,66 (d, 2H), 3,22 (m, 2H), 3,01 (t, 2H), 2,21 (m, 1H), 1,98 (d, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,68 (m, 2H), 1,52 (m, 2H), 1,01 (t, 3H).

(5) una solución del compuesto preparado en (4) anteriormente (51 mg) y hidrogenofosfonato de 1,2-dipalmitil-sn-glicerilo (93 mg; compuesto V1, $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{palmitoilo}$) en piridina (6,4 ml) se trató con cloruro de pivaloilo (0,047 ml) y la mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. A continuación se añadió una solución de yodo (129 mg) en piridina-agua (19:1, v/v), y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, se diluyó con CHCl_3 , y a continuación se inactivó con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 1 M. La capa acuosa se extrajo dos veces con CHCl_3 y las capas orgánicas combinadas se lavaron con borato de trietilamonio 1 M (pH 8). La capa orgánica se secó (Na_2SO_4) y se concentró. La cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con $\text{CHCl}_3-\text{MeOH}-\text{Et}_3\text{N}$ (gradiente de elución; 90:10:1→75:25:1) dio como resultado 38 mg (30 %) de 6-amino-2-butoxi-9-[N-(2-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo)etil)-4-piperidinilmetil]-8-hidroxipurina como un sólido blanquecino. RMN ^1H ($\text{CDCl}_3-\text{CD}_3\text{OD}$, 400 MHz): δ 5,17 (s a, 1H), 4,32 (dd, 1H), 4,20-4,09 (m, 5H), 3,98 (t a, 2H), 3,69 (d a, 3H), 3,23 (s a, 1H), 1,86 (s a, 4H), 1,69 (m, 2H), 1,53 (s a, 4H), 1,42 (dd, 2H), 1,20 (m, 48H), 0,91 (t, 3H), 0,83 (t, 6H); HRMS calculado para $[\text{M}-\text{H}]$ $\text{C}_{52}\text{H}_{94}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{P}$ 993,6768, encontrado 993,6782.

Ejemplo 2 (Compuesto A2)

Preparación de 6-Amino-2-butoxi-9-[N-(2-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosforamido)etil)-4-piperidinilmetil]-8-hidroxipurina (compuesto (II), $\text{R}_1=\text{n-butoxi}$, $\text{n}=1$, $\text{X}=\text{CH}$, $\text{Q}=\text{NH}$, $\text{Z}=\text{O}$, $\text{W}=\text{O}$, $\text{m}=2$, $\text{p}=1$, $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{n-C}_{15}\text{H}_{31}\text{CO}$)



(1) De la misma manera como se describe en el Ejemplo 1-(3), el compuesto preparado en el Ejemplo 1-(2) (107 mg) se alquiló en DMF (1,1 ml) con bromuro de 2-(*tert*-butoxicarbonilamino)etilo (67 mg) en presencia de K_2CO_3 para dar 84 mg (67 %) de 4-[6-amino-2-butoxi-8-metoxi-purin-9-il]metil-1-piperidiniletilaminilcarboxilato de 1,1-dimetiletilo como un sólido blanquecino. RMN ^1H ($\text{CDCl}_3-\text{CD}_3\text{OD}$, 400 MHz): δ 4,25 (t, 2H), 3,73 (d, 2H), 3,38 (m, 2H), 3,20 (m, 2H), 2,89 (m, 2H), 2,44 (m, 2H), 1,97 (t, 3H), 1,75 (m, 2H), 1,66 (m, 2H), 1,42-1,51 (m, 11H),

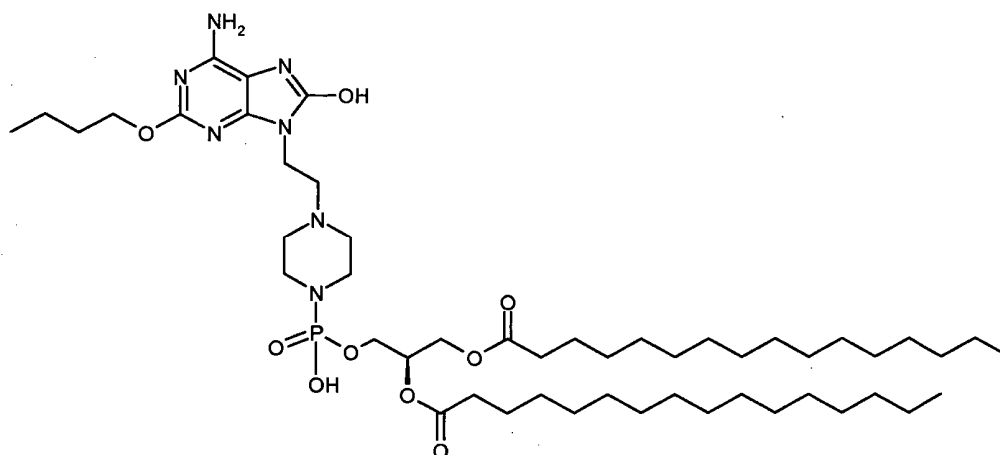
0,97 (t, 3H).

(2) De la misma manera como se ha descrito en el Ejemplo 1-(4), el compuesto preparado en (1) anteriormente (83 mg) se desprotegió en N con HCl 4 N en dioxano para dar 58 mg (74 %) de diclorhidrato de 6-amino-2-butoxi-9-[N-(2-aminoetil)4-piperidinilmetil]-8-hidroxipurina como un sólido blanquecino. RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 4,15 (t, 2H), 3,58 (d, 2H), 2,88 (t, 2H), 2,81 (d, 2H), 2,46 (t, 2H), 1,91 (t, 2H), 1,79 (m, 1H), 1,64 (m, 2H), 1,52 (m, 2H), 1,39 (dd, 2H), 1,28 (m, 2H), 0,91 (t, 3H).

(3) una solución de hidrogenofosfonato de 1,2-dipalmitoil-sn-glicerilo (167 mg; compuesto V1, R₁=R₂=palmitoil) en piridina (11,3 ml) se trató con clorotrimetilsilano (0,087 ml) y trietilamina (0,126 ml) y la mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 h. Una suspensión del compuesto preparado en (2) anteriormente (37 mg) y trietilamina (0,126 ml) en piridina (2,3 ml) se añadió a la mezcla de reacción seguido por la adición de yodo (75 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, se concentró, y se evaporó simultáneamente dos veces con tolueno. La cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice con CHCl₃-MeOH-Et₃N (gradiente de elución; 90:10:1→75:25:1) dio como resultado 39 mg (18 %) de 6-amino-2-butoxi-9-[N-(2-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosforamido)etil-4-piperidinilmetil]-8-hidroxipurina como un sólido vítreo naranja. R_f (CHCl₃-CH₃OH-H₂O-NH₄OH) = 0,68.

Ejemplo 3 (Compuesto A3)

Preparación de 6-Amino-2-butoxi-9-[1-(1, 2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosforamido)-4-piperaziniletil]-8-hidroxipurina (Compuesto (II), R₁=n-butoxi, n=2, X=N, Q=enlace único, Z=O, W=O, m=0, p = 1, R₁=R₂= n-C₁₅H₃₁CO)



(1) De la misma manera como se describe en el Ejemplo 1-(1), 6-amino-2-butoxi-8-metoxipurina (131 mg) se alquiló en DMF con 4-(bromoetil)-1-piperazinecarboxilato de 1,1-dimetiletilo (120 mg) en presencia de K₂CO₃ para dar 124 mg (74 %) de 4-[6-amino-2-butoxi-8-metoxi-purin-9-il]etil-1-piperazinecarboxilato de 1,1-dimetiletilo como un sólido de color amarillo claro. RMN ¹H (CDCl₃-CD₃OD, 400 MHz): δ 5,66 (d, 2H), 4,25 (t, 2H), 4,05 (t, 2H), 4,10 (s, 3H), 3,35 (a s, 4H), 2,71 (t, 2H), 2,46 (a s, 4H), 1,76 (m, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,45 (s, 9H), 0,96 (t, 3H).

(2) De la misma manera como se describe en el Ejemplo 1-(2), el compuesto preparado en (1) anteriormente (124 mg) se desprotegió en N con HCl 4,0 M en dioxano para dar 87 mg (77 %) de clorhidrato de 6-amino-2-butoxi-9-(4-piperaziniletil)-8-hidroxipurina como un sólido de color blanquecino. RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) δ 4,26 (t, 2H), 3,96 (m, 2H), 3,11 (m, 5H), 2,78 (m, 7H), 1,73 (m, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,38 (m, 1H), 0,98 (t, 3H); RMN ¹³C 161,8, 155,6, 150,8, 149,7, 100,1, 68,8, 55,9, 50,8, 44,2, 37,7, 31,9, 20,1, 14,1; HRMS calculado para [M+H]⁺ C₁₅H₂₅N₇O₂ 336,2136, encontrado 336,2148.

(3) De la misma manera como se describe en el Ejemplo 2-(3), el compuesto preparado en (2) anteriormente (288 mg) se fosfatidiló con hidrogenofosfonato de 1,2-dipalmitoil-sn-glicerilo (518 mg) para dar 313 mg (46 %) de 6-amino-2-butoxi-9-[1-(1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosforamido)-4-piperaziniletil]-8-hidroxipurina como un sólido de color castaño. RMN ¹H (CDCl₃-CD₃OD, 400 MHz): δ 5,11 (s a, 1H), 4,28 (d, 1H), 4,12-4,01 (m, 5H), 3,76 (s a, 2H), 3,60-2,60 (m, 11H), 2,21 (m, 4H), 1,65 (m, 2H), 1,49 (m, 4H), 1,39 (c, 2H), 1,17 (m, 48H), 0,88 (t, 3H), 0,81 (t, 6H); HRMS calculado para [M-H]⁻ C₅₀H₉₂N₇O₉P 964,6616, encontrado 964,6600.

Los inventores evaluaron la capacidad de los ligandos de TLR7 para promover diversos aspectos de la respuesta inmunitaria en ratones. Se investigó específicamente la inmunidad innata para concluir si los compuestos de TLR7 lipidados eran capaces de inducir quimioquinas innatas y citoquinas proinflamatorias. Esta respuesta inmunitaria innata proporciona al cuerpo una protección no específica inicial frente a los patógenos. Entre estas quimioquinas y citoquinas innatas, se piensa que IFN de tipo I se va a requerir para la programación de los linfocitos T CD8 no expuestos a tratamiento anteriormente con respecto a la supervivencia, diferenciación y desarrollo de la memoria. Los estudios de ratones han sugerido también que la magnitud y duración de la inflamación regula la velocidad a la cual los linfocitos T CD8⁺ adquieren las características de memoria.

Ejemplo 4 Preparación de liposomas TLR7-DPPC

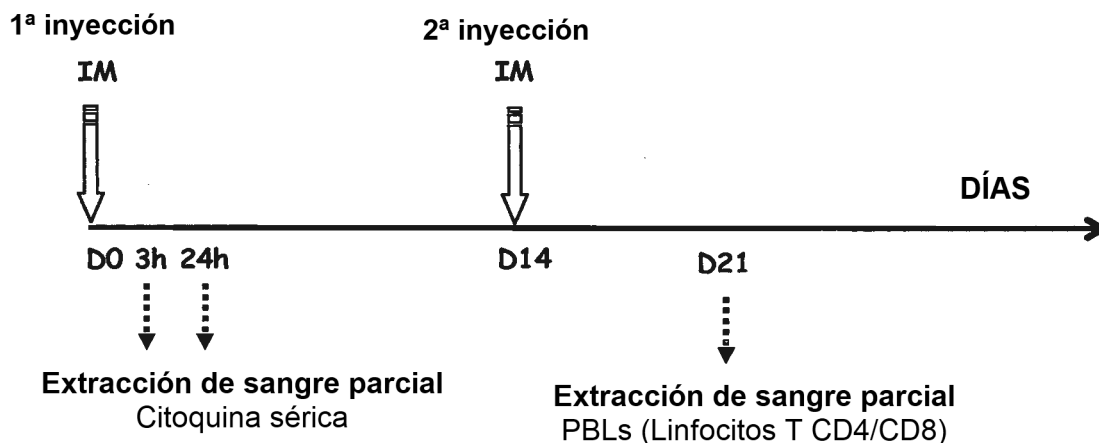
10,4 ml de TLR7-L A1 lipídica a 10 mg/ml en cloroformo se transfirieron en un vial de vidrio de fondo redondeado. A este vial se añadieron 18,4 ml de DPPC solubilizado en cloroformo a 100 mg/ml. 21,9 ml de compuesto L-TLR7 lipídico solubilizado con A3 a 5 mg/ml en cloroformo se transfirieron a un vial de vidrio de fondo redondeado. A este vial se añadieron 20 ml de DPPC solubilizado en cloroformo a 100 mg/ml. Se evaporó el cloroformo en un Rotavapor Büchi con una lenta disminución de presión. La película obtenida se desecó adicionalmente al menos durante la noche en un desecador al vacío. Después de eso, la película lipídica se hidrató lentamente en un agitador orbital (velocidad máxima: 250 rpm) usando PO₄ 50 mM - NaCl 100 mM, pH 7 tampón precalentado a 60 °C.

Tras la finalización de la resuspensión, Se llevó a cabo una etapa de hinchamiento a fin de aumentar adicionalmente la hidratación del fosfolípido, esta consiste en incubar la preparación a temperatura ambiente. A continuación la suspensión se pre-homogeneizó usando un homogeneizador de rotor-estátor (X620 CAT) durante 12 min a 8000 rpm,.

A continuación se llevó a cabo la microfluidización utilizando un microfluidizador (Modelo 110S-Serie 90181-Microfluidics Corporation) a 6 bares manteniendo a la vez la cámara de microfluidización a aproximadamente 40 °C. Se consiguió la filtración en estéril en un filtro PES (GD/X 0,2 µm, 25 mm, Whatman).

Ejemplo 5: 20080672: modelo SIV-p27 - liposomas DPPC - A3 y A1

Las moléculas A3 y A1 lipídicas se evaluaron *in vivo*. Las formulaciones que contenían SIV-p27 resumidas en la Tabla 1 se usaron para vacunar ratones C57BL/6 hembra de 6-8 semanas de edad (10/grupo). Los ratones recibieron dos inyecciones intramusculares de 50 µl, con 14 días de separación y se mezclaron en diferentes puntos temporales tras la estimulación y el refuerzo como se ilustra a continuación.



Las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas inducidas por las formulaciones que contienen los agonistas de TLR7 y el adyuvante AS01B registrado (QS21+MPL) se compararon también con el inducido por las formulaciones que contienen el AS01 B correspondiente y los liposomas DPPC vacíos.

Tabla 1: TABLA RESUMEN DEL CONTENIDO DE LAS FORMULACIONES

Todos los compuestos están en µg salvo que se indique otra cosa.

Grupos vacunados	SIV-p27	MPL	QS21	A3*	A1*	DPPC	CpG
p27 1B + DPPC vacío	5	5	5	-	-	3970	-
p27 1B + 200 µg de A3-DPPC	5	5	5	200	-	3235	-
p27 1B + 45 µg de A3-DPPC	5	5	5	45	-	726	-
p27 1B + 4,5 µg de A3-DPPC	5	5	5	4,5	-	73	-
p27 1B + 200 µg de A1-DPPC	5	5	5	-	200	2519	-
p27 1B + 45 µg de A1-DPPC	5	5	5	-	45	566	-
p27 1B + 4,5 µg de A1-DPPC	5	5	5	-	4,5	57	-
p27 1B + CpG	5	5	5	-	-	-	42
no expuesto a tratamiento anteriormente	-	-	-	-	-	-	-

* Las dosis se basan en la cantidad de TLR7-L usado para fabricar los liposomas A1- DPPC y A3-DPPC. Las dosis inyectadas reales pueden ser inferiores debido a la pérdida de la duración de la filtración

5 Se observaron diferentes perfiles de citoquinas entre el grupo de referencia AS01B y las formulaciones que contienen los grupos inmunizados con TLR7-L. Poco después de la inyección (3 h), Se detectó IFN-alfa de una manera dependiente de la dosis en el suero de los ratones inmunizados con TLR7-L cuando se formularon en un liposoma-DPPC (Figura 1). Dicha respuesta innata de IFN α sérico no se observó cuando los TLR7-L se formularon en un liposoma-DOPS/DOPC (no se muestran los datos).

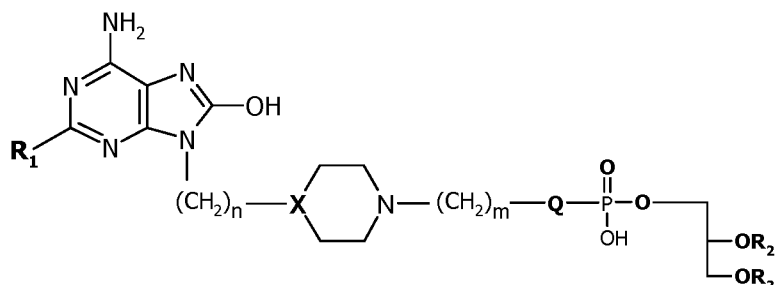
10 Otras citoquinas inflamatorias tales como TNF- α and IL-6 se potenciaron cuando A3 o A1 estuvieron presentes en las formulaciones, siendo A1 más potente que A3 (Figura 2). La quimioquina MCP-1 se potenció también en presencia de ambos compuestos (Figura 3). En total, Estos datos muestran que las moléculas lipidadas TLR7-L son eficaces en la inducción de IFN de tipo I y en la potenciación de las respuestas de las citoquinas proinflamatorias cuando se combinan con una formulación basada en MPL/QS21.

Las moléculas TLR7 usadas aquí no potenciaron además la respuesta de los linfocitos T adaptativos en comparación con el grupo de referencia AS01 (no se muestra los datos)

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la estructura de la Fórmula IX,

(IX)



R₁ es alcoxi C₁₋₆ o alcoxi C₁₋₆alquilo C₁₋₆

n es 0 o un número entero entre 1-2;

X es CH o N;

Q es O, NH

m es 0 o un número entero entre 1-2;

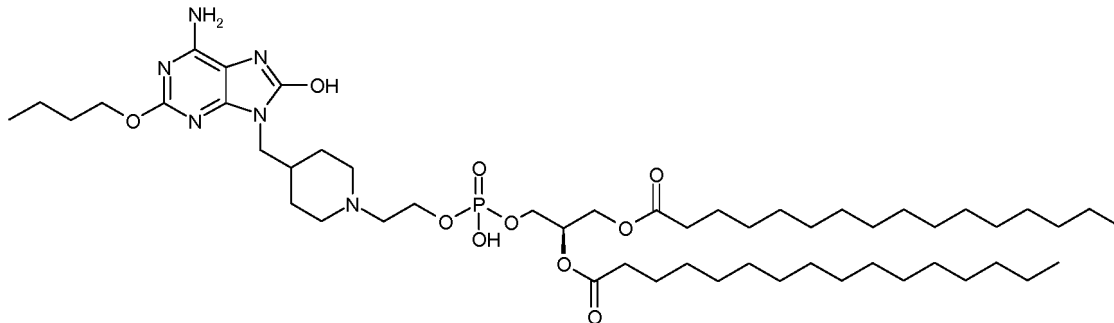
R₂ es H o un alquilo o acilo C₄-C₂₄ lineal, ramificado, o insaturado, y

R₃ es un alquilo o acilo C₄-C₂₄ lineal, ramificado, o insaturado;

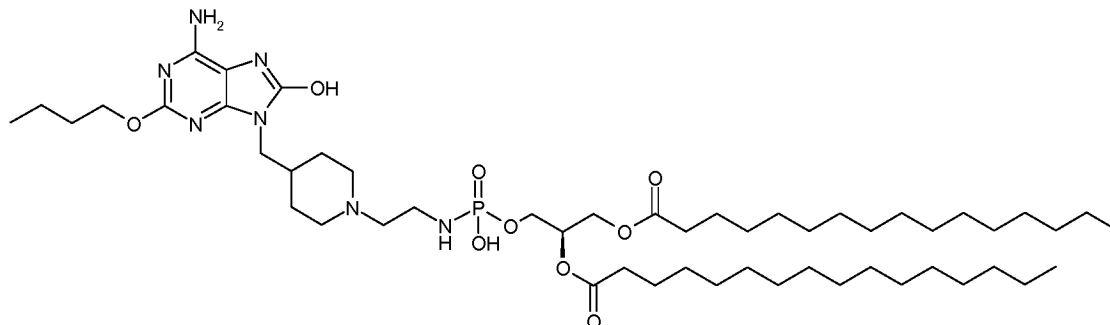
o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X es CH.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado entre el grupo que consiste en

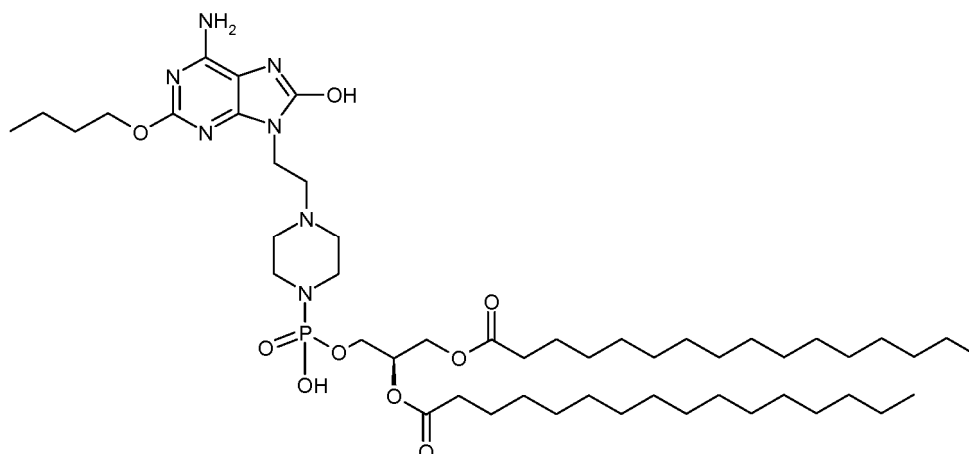


(A1)



(A2),

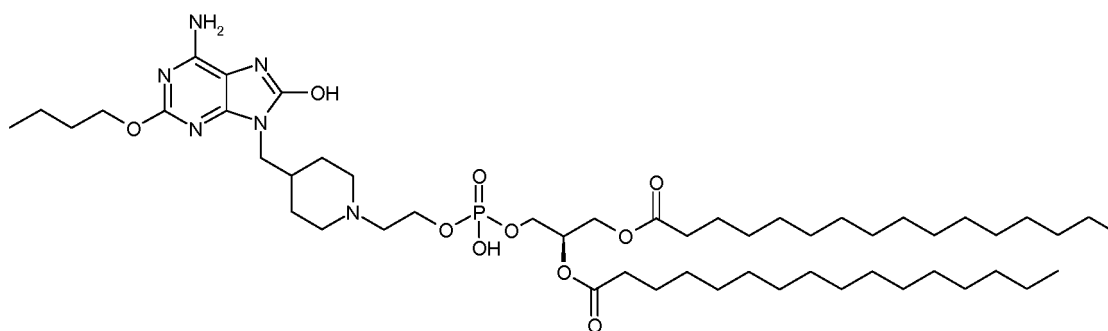
y



(A3);

o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

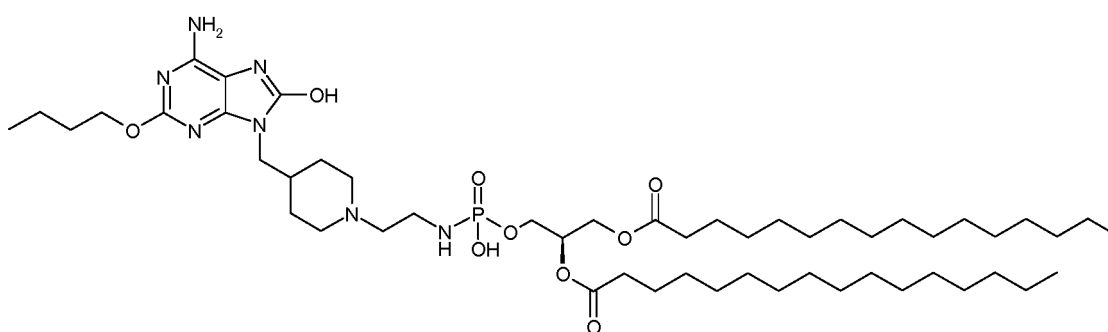
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, que tiene la estructura:



5

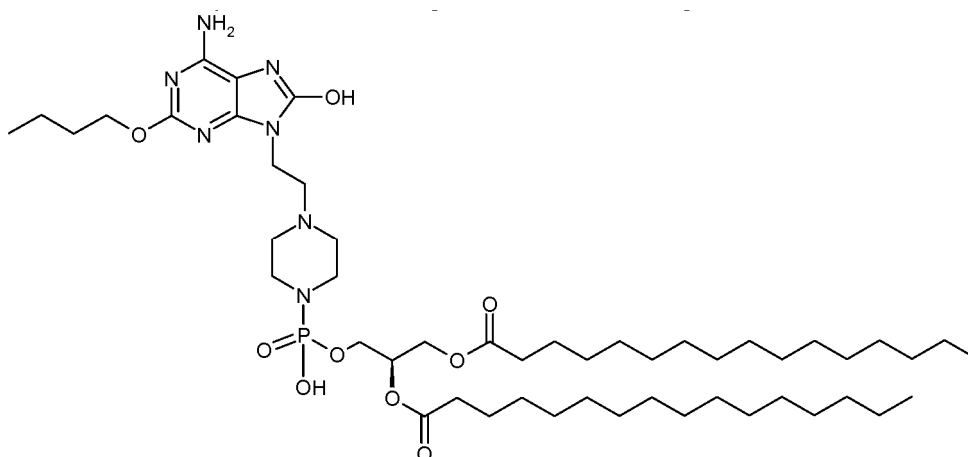
o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

5. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, que tiene la estructura:



o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

10 6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, que tiene la estructura:

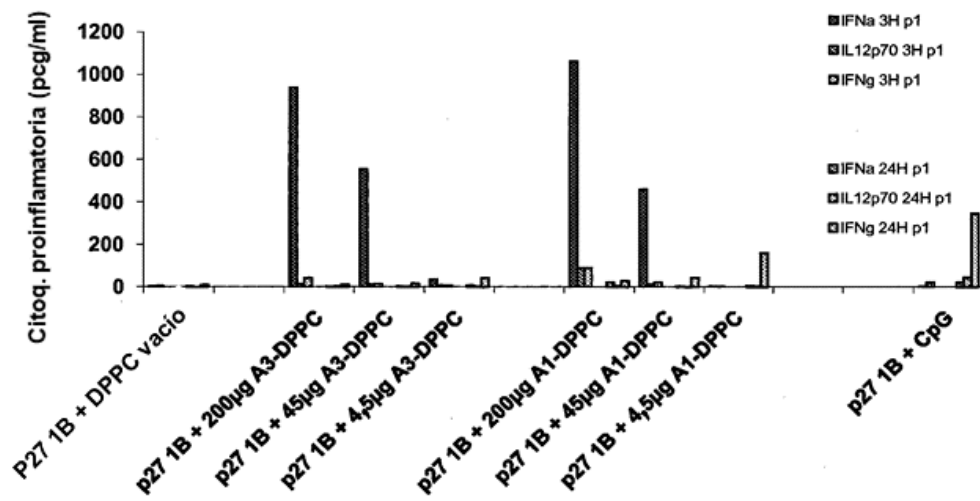


o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

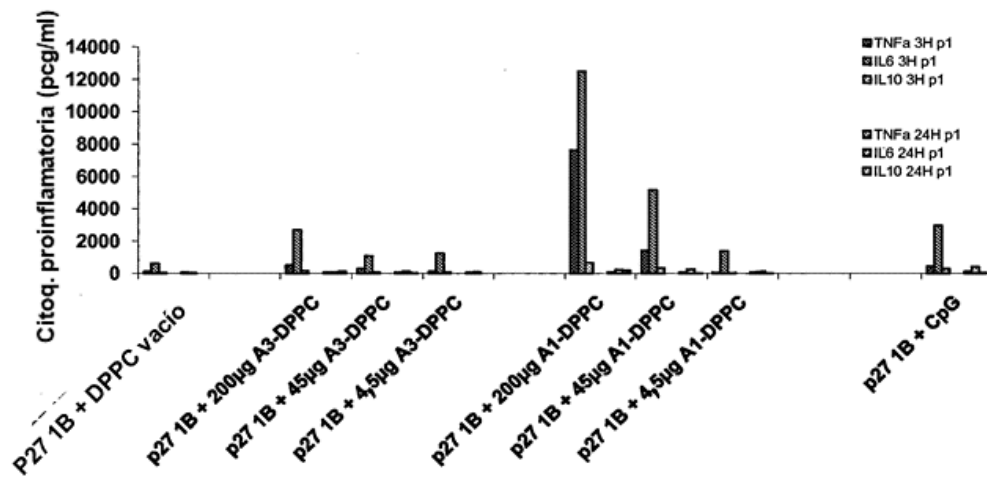
7. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso como un adyuvante de vacuna.

- 5 8. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria innata, induciendo una respuesta IFN de tipo 1 o potenciando las citoquinas proinflamatorias.

Producción de IFN α , IL12p70 e IFN γ : citoquinas proinflamatorias detectadas en suero 3 h y 24 h después de la 1ª inyección



Producción de TNF α , IL6 e IL10: citoquinas proinflamatorias detectadas en suero 3 h y 24 h después de la 1ª inyección



Producción de MPC-1: quimioquina detectada en suero 3 h y 24 h después de la 1ª inyección

