

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 361**

51 Int. Cl.:

C07D 239/48 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2014 PCT/EP2014/053273**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14128189**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2014 E 14705356 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2958900**

54 Título: **Derivados de 2-aminopirimidina para el tratamiento de infecciones víricas**

30 Prioridad:

21.02.2013 EP 13156167

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

28.11.2019

73 Titular/es:

**JANSSEN SCIENCES IRELAND UNLIMITED
COMPANY (100.0%)
Barnahely, Ringaskiddy
Co Cork, IE**

72 Inventor/es:

**MC GOWAN, DAVID CRAIG;
RABOISSON, PIERRE JEAN-MARIE BERNARD y
JONCKERS, TIM HUGO MARIA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 733 361 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 2-aminopirimidina para el tratamiento de infecciones víricas

Esta invención se refiere a derivados de 2-aminopirimidina, procesos para su preparación, composiciones farmacéuticas y su uso en el tratamiento de infecciones víricas.

5 La presente invención se refiere al uso de derivados de 2-aminopirimidina en el tratamiento de infecciones víricas, trastornos inmunitarios o inflamatorios, donde interviene 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.

10 Se ha estimado que la mayoría de las especies de mamíferos tienen entre diez y quince tipos de receptores de tipo Toll. Se han identificado trece TLR (denominados 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 encuentran en los seres humanos. Otras especies que no sean mamíferos pueden tener TLR distintos a los de los mamíferos, como demuestra TLR14, que se encuentra en el pez globo Takifugu. Esto puede complicar el proceso de utilización de animales de experimentación como modelos de inmunidad innata humana.

15 Para consultar artículos de revisión sobre TLR, 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.

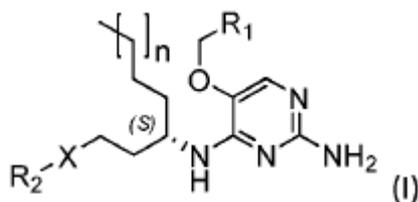
20 Previamente se han descrito compuestos que presentan actividad sobre los receptores de tipo Toll, tales como derivados de purina en WO 2006/117670, derivados de adenina en WO 98/01448 y WO 99/28321, y pirimidinas en WO 2009/067081.

30 Sin embargo, se requiere disponer con urgencia de moduladores de receptores de tipo Toll novedosos que presenten una selectividad preferida, mayor potencia, mayor estabilidad metabólica y un perfil de seguridad mejorado en comparación con los compuestos de la técnica anterior.

La técnica anterior incluye el documento WO 2012/136834, que se refiere a derivados de pirimidina y su uso en el tratamiento de infecciones víricas. Los compuestos descritos tienen una cadena lateral de alquilamina, alquenilamina, alquililamina o alcoxilamina.

35 Otra divulgación anterior sobre derivados de pirimidina que tienen una cadena lateral de alquilamina o alcoxilamina es el documento WO 2010/133885. Se indica que los compuestos contenidos en ese documento se utilizan en el tratamiento del cáncer.

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



40 o una de sus sales, tautómeros, formas estereoisoméricas, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables, donde X representa S, S=O o O=S=O,

R₁ es hidrógeno, alquilo (C₁₋₆), alcoxi (C₁₋₆) o arilo;

R₂ es alquilo (C₁₋₃) o cicloalquilo (C₃₋₆) y n = 1 o 2.

45 Los compuestos de fórmula (I) y sus sales, tautómeros, formas estereoisoméricas, 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 y/o TLR8).

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

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

Otro aspecto de la invención consiste en que un compuesto de fórmula (I) o una de sus sales, solvatos, tautómeros, formas estereoisoméricas o polimorfos farmacéuticamente aceptables, o dicha composición farmacéutica que comprende dicho compuesto de fórmula (I) o una de sus sales, solvatos, tautómeros, formas estereoisoméricas o polimorfos farmacéuticamente aceptables se puede utilizar según corresponda en el tratamiento de un trastorno en el que intervenga la modulación de TLR, de forma más específica TLR7 y/o TLR8.

El término "alquilo (C₁₋₆) o alquilo (C₁₋₃)" se refiere a un hidrocarburo alifático saturado de cadena lineal, de cadena ramificada o cíclico que contiene el número especificado de átomos de carbono.

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 4, 5, 6 o 7 átomos anulares. En particular, dicha estructura anular aromática puede tener 5 o 6 átomos anulares.

El término "alcoxi (C₁₋₆)" se refiere a un grupo alquilo (cadena de carbono e hidrógeno) unido con un único enlace a oxígeno como, por ejemplo, un grupo metoxi o un grupo etoxi.

El término "cicloalquilo (C₃₋₆)" se refiere a un anillo carbocíclico que contiene el número especificado de átomos de carbono.

Tal como se utiliza en la presente, cualquier fórmula química con enlaces que se muestren solo como líneas continuas y no como enlaces en forma de cuña continua o en forma de cuña discontinua, o que se indique de otro modo que tiene una configuración particular (p. ej., *R*, *S*) alrededor de uno o más átomos, contemplará cada estereoisómero o mezcla de dos o más estereoisómeros posible.

Las expresiones "estereoisómeros", "formas estereoisoméricas" o "formas estereoquímicamente isoméricas" se utilizan indistintamente con anterioridad o en lo sucesivo en la presente.

La invención incluye todos los estereoisómeros de los compuestos de la invención, ya sea como un estereoisómero puro o como una mezcla de dos o más estereoisómeros.

Los enantiómeros son estereoisómeros que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Una mezcla 1:1 de un par de enantiómeros es un racemato o mezcla racémica.

Los diastereómeros (o diastereoisómeros) son estereoisómeros que no son enantiómeros, es decir, que no están relacionados como imágenes especulares. Si un compuesto contiene un doble enlace, los sustituyentes pueden estar en la configuración *E* o *Z*. Si un compuesto contiene al menos un grupo cíclico no aromático disustituido, los sustituyentes pueden estar en la configuración *cis* o *trans*.

Por lo tanto, la invención incluye enantiómeros, diastereómeros, racematos, isómeros *E*, isómeros *Z*, isómeros *cis*, isómeros *trans* y mezclas de estos, siempre que sea químicamente posible.

Los expertos en la técnica estarán familiarizados con el significado de todos estos términos, es decir, enantiómeros, diastereómeros, racematos, isómeros *E*, isómeros *Z*, isómeros *cis*, isómeros *trans* y mezclas de estos.

La configuración absoluta se especifica de acuerdo con el sistema de Cahn-Ingold-Prelog. La configuración en un átomo asimétrico se especifica como *R* o *S*. Los estereoisómeros resueltos cuya configuración absoluta se desconoce se pueden designar como (+) o (-), dependiendo de la dirección en la cual hagan rotar el plano de la luz polarizada. Por ejemplo, los enantiómeros resueltos cuya configuración absoluta se desconoce se pueden designar como (+) o (-), dependiendo de la dirección en la cual hagan rotar el plano de la luz polarizada.

Cuando se identifica un estereoisómero específico, esto quiere decir que dicho estereoisómero está sustancialmente exento, es decir, asociado con menos de un 50%, preferentemente menos de un 20%, más preferentemente menos de un 10%, aún más preferentemente menos de un 5%, en particular menos de un 2% y aún más preferentemente menos de un 1%, de los otros estereoisómeros. Por lo tanto, cuando se especifica que un compuesto de Fórmula (I) es, por ejemplo, (*R*), esto quiere decir que el compuesto está sustancialmente exento del isómero (*S*); cuando se especifica que un compuesto de Fórmula (I) es, por ejemplo, *E*, esto quiere decir que el compuesto está sustancialmente exento del isómero *Z*; cuando se especifica que un compuesto de Fórmula (I) es, por ejemplo, *cis*, esto quiere decir que el

compuesto está sustancialmente exento del isómero *trans*.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) incluyen sus sales de adición de ácido y 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.

- 5 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.

- 10 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
15 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.

- 20 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 principio activo, en mezcla 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
25 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 administración sencilla, 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
30 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 pueden ser 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.

- 35 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 dichas formas farmacéuticas unitarias son comprimidos (incluidos los comprimidos ranurados o recubiertos), cápsulas, pastillas, sobres de polvos, obleas, supositorios, soluciones o suspensiones inyectables y similares, y múltiples segregados de estos.
45

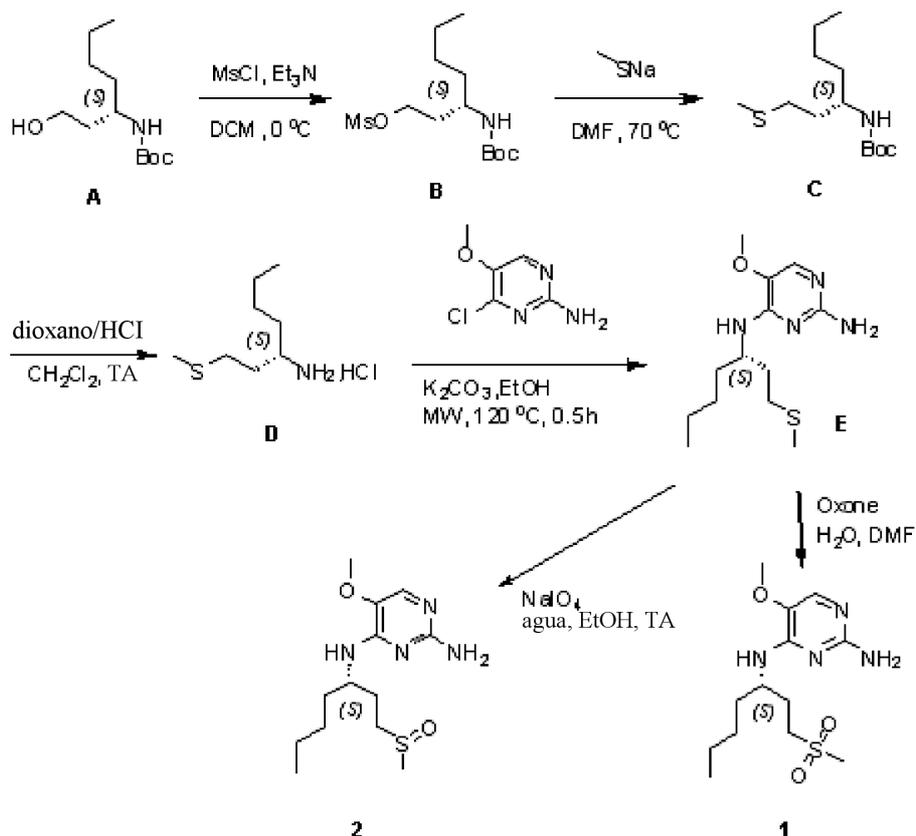
- 50 Los expertos en el tratamiento de enfermedades infecciosas serán capaces de determinar la cantidad eficaz a partir de los resultados de las pruebas que se presentan posteriormente en la presente. En general, se considera que una cantidad diaria eficaz sería de 0.01 mg/kg a 50 mg/kg de peso corporal, 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.
55

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

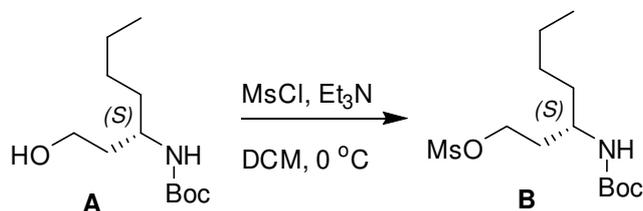
5 general del paciente particular, así como también de otra medicación que el individuo pueda estar tomando, como bien sabrán los expertos en la técnica. Además, es obvio que la cantidad eficaz se puede reducir o incrementar dependiendo de la respuesta del sujeto tratado y/o dependiendo de la evaluación 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.

Preparación de los compuestos de fórmula (I)

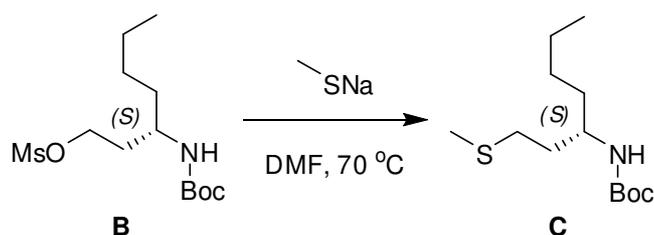
Esquema global. El compuesto **A** se preparó de acuerdo con procedimientos descritos en los documentos WO2008147697 y WO2009067081.



10 Sección experimental

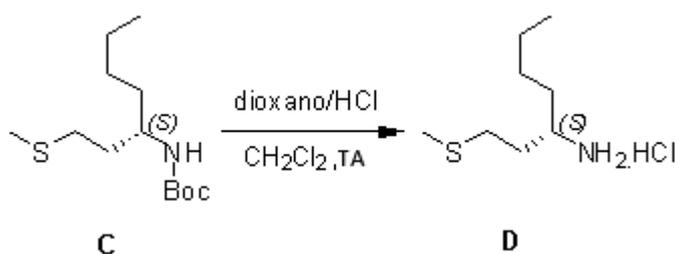


15 Se añadió trietilamina (10.5 g, 103.75 mmol, 2.4 eq.) a la solución de **A** (10 g, 43.23 mmol, 1 eq.) en CH₂Cl₂ (200 mL) a 0 °C. Se añadió cloruro de metanosulfonilo (6.4 g, 55.87 mmol, 1.3 eq.) gota a gota a la solución y se agitó 1.5 horas a 0 °C. Se añadió CH₂Cl₂ (500 mL). La solución se lavó con NaHCO₃ ac., salmuera y se secó con Na₂SO₄, los sólidos se eliminaron por filtración y el disolvente del filtrado se eliminó a presión reducida para obtener **B**. Se utilizó como tal sin purificación adicional.

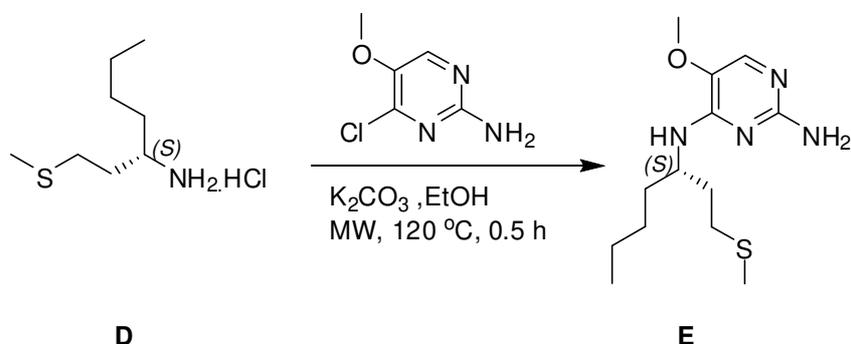


5 Una mezcla de **B** (12 g, 38.782 mmol, 1 eq.) y tiometóxido de sodio (4.08 g, 58.17 mmol, 1.5 eq.) en DMF (60 mL) se agitó durante toda la noche a 70 °C. Los sólidos se separaron por filtración y los disolventes del filtrado se eliminaron a presión reducida. El crudo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua, salmuera, y se secó con Na₂SO₄, los sólidos se separaron por filtración y los disolventes del filtrado se eliminaron a presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: de 40/1 a 3/1 de éter de petróleo/acetato de etilo) para obtener **C**.

¹H RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 0.70 – 0.85 (m, 5 H), 1.15 - 1.49 (m, 13 H), 1.49 – 1.61 (m, 1 H), 1.61 – 1.80 (m, 1 H), 2.05 (s, 3 H), 2.38 - 2.50 (m, 2 H), 3.51 (s a., 1 H), 4.25 (s a., 1 H)

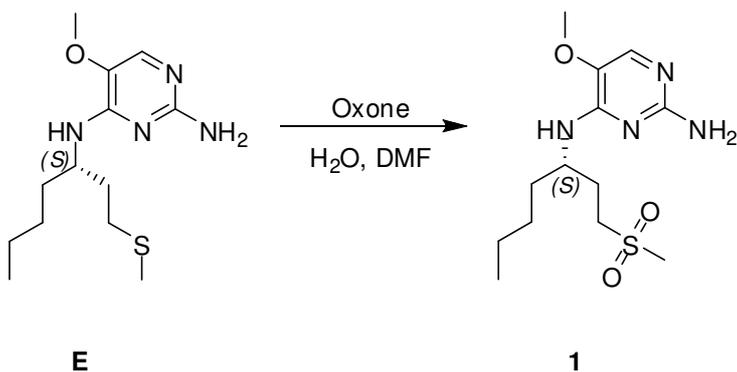


10 Se añadieron HCl/dioxano (47 mL, 187.43 mmol, 10 eq.) gota a gota a una solución agitada de **C** (4.9 g, 18.74 mmol, 1 eq.) en CH₂Cl₂ a 0 °C y se agitó durante 1 hora a 25 °C. La solución se concentró a presión reducida para obtener **D**. Se utilizó como tal en el siguiente paso.



15 Se mezclaron **D** (0.75 g, 3.79 mmol, 1 eq.), 2-amino-4-cloro-5-metoxipirimidina (0.908 g, 5.69 mmol, 1.5 eq.) y K₂CO₃ (1.57 g 11.38 mmol, 3 eq.) en etanol (20 mL). La mezcla se agitó a 120 °C en el microondas durante 30 minutos. El disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía en capa fina de sílice preparativa (eluyente: CH₂Cl₂: CH₃OH = 20:1) para obtener **E**.

¹H RMN (400 MHz, cloroformo-*d*) δ ppm 1.05 – 1.15 (m, 3 H), 1.40 - 1.60 (m, 4 H), 1.95 (m, 2H), 2.15 (m, 1 H), 2.30 (d, 3 H), 2.70 (t, 1 H), 2.90 (t, 1 H), 3.55 (m, 1 H), 4.50 (m, 1 H), 3.95 (s, 3 H), 6.20 (d, 1H), 6.60 (s a., 2 H), 7.45 (s, 1 H)

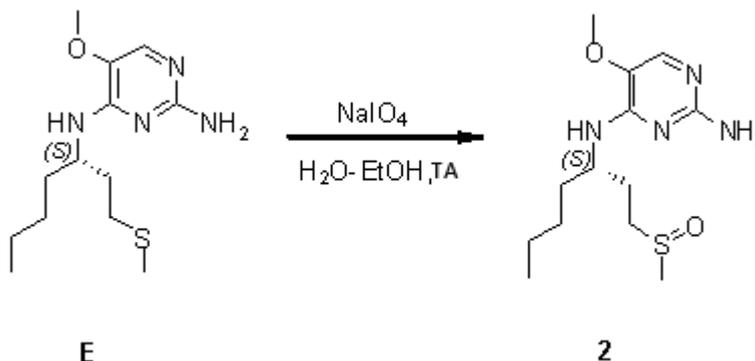


ES 2 733 361 T3

Se añadió Oxone (6.959 g, 11.32 mmol, 3 eq.) A una solución de **E** (1.45 g, 3.773 mmol, 1 eq.) en DMF (100 mL) y agua (100 mL). La mezcla se agitó durante 12 horas a 20 °C. Los sólidos se separaron por filtración y el filtrado se basificó hasta pH=8 con solución acuosa sat. de Na₂CO₃. La mezcla resultante se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución preparativa (columna: gemini 150 x 30 mm x 5µm, C18, fase móvil: CH₃CN/agua (0.05% de HCl), Gradiente: 2-32% de CH₃CN, 0-8 min, flujo: 30 mL /min). Las mejores fracciones se combinaron y se concentraron a presión reducida para obtener **1**.

LC-MS 3.88 min

¹H RMN (400 MHz, metanol-*d*₄) δ ppm 0.92 (t, *J*=6.9 Hz, 3 H), 1.21 - 1.50 (m, 4 H), 1.69 (c, *J*=7.1 Hz, 2 H), 1.95 - 2.28 (m, 2 H), 2.98 (s, 3 H), 3.09 - 3.22 (m, 2 H), 3.87 (s, 3 H), 4.37 - 4.55 (m, 1 H), 7.26 (s, 1 H) no se observaron protones lábiles.



Una solución de **E** (40 mg, 0.14 mmol, 1 eq.) en etanol (40 mL) se trató con una solución de NaIO₄ (0.2 g, 1 mmol, 7.5 eq.) en agua (10 mL) y a continuación se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución se concentró al vacío. El residuo se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron con Na₂SO₄, los sólidos se separaron por filtración y el disolvente del filtrado se eliminó a presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución preparativa (columna C18, eluyente: de 3/97 a 33/67 de CH₃CN, H₂O, 0.05% de HCl). Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron al vacío para obtener **2**.

LC-MS 3.78 min

¹H RMN (400 MHz, metanol-*d*₄) δ ppm 0.90 (t, *J*=6.8 Hz, 3 H), 1.19 - 1.49 (m, 4 H), 1.67 (d, *J*=6.5 Hz, 2 H), 1.91 - 2.15 (m, 2 H), 2.63 (s a., 3 H), 2.69 - 2.96 (m, 2 H), 3.85 (s, 3 H), 4.46 (s a., 1 H), 7.25 (s, 1 H) no se observaron protones lábiles.

Método analítico de LC-MS.

Columna	YMC-PACK ODS-AQ, 50x2.0 mm, 5 µm		
Fase móvil	A :H ₂ O (0.1% de TFA)		
	B:acetonitrilo (0.05% de TFA)		
	TIEMPO (min)	% de A	% de B
	0	100	0
	1	100	0
	5	40	60
	7.5	40	60
8	100	0	
Flujo	0.8 mL/min		
Longitud de onda	UV 220 nm		
Temperatura de la columna	50 °C		
Polaridad de MS	positiva		
LCMS	Agilent 1100		

Actividad biológica de los compuestos de fórmula (I)

Descripción de los ensayos biológicos

Evaluación de la actividad de TLR7 y TLR8

5 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 de 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 CO₂. A 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 1.25×10^5 células/mL. A continuación, se dispensaron cuarenta microlitros de células en cada pocillo en placas de 384 pocillos, donde ya había 200 nL de compuesto en un 100% de DMSO. Después de 6 horas de incubación a 37 °C con un 5% de CO₂, se determinó la actividad luciferasa añadiendo 15 µL de sustrato Steady Lite Plus (Perkin Elmer) a cada pocillo y la lectura se realizó con un generador de imágenes de microplacas ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Se generaron curvas de dosis-respuesta a partir de las 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.

20 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 de CMV-TLR7 solo (1.25×10^5 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 CO₂ 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 CC₅₀.

25 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 constructo marcador NFκB-luc solo (1.25×10^5 células/mL). Después de seis horas de incubación a 37 °C con un 5% de CO₂, se determinó la actividad luciferasa añadiendo 15 µL de sustrato Steady Lite Plus (Perkin Elmer) a cada pocillo y la lectura se realizó con un generador de imágenes de microplacas ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). Los datos de los sistemas celulares de cribado inverso se presentan como CME.

30 Activación de elementos promotores de ISRE

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 GAAACTGAAACT 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 estableció una línea celular HEK293 transfectada de forma estable con pISRE-Luc (HEK-ISREluc) para analizar los medios de cultivo de células PBMC acondicionadas.

40 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 con un 10% de suero AB humano y se dispensaron 2×10^5 células/pocillo en placas de 384 pocillos que contenían los compuestos (70 µL de volumen total). Después de incubarlas durante toda la noche, se transfirieron 10 µL de sobrenadante a placas de 384 pocillos que contenían 5×10^3 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 ISRE mediante el análisis de la actividad luciferasa utilizando 40 µL/pocillo de sustrato Steady Lite Plus (Perkin Elmer) y se midió con un generador de imágenes de microplacas ViewLux ultraHTS (Perkin Elmer). La actividad estimuladora de cada compuesto sobre las células HEK-ISREluc se indicó como un valor de CME, que se define como la concentración del compuesto aplicada a las PBMC que provoca una actividad luciferasa al menos dos veces superior a 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 α-2a recombinante (Roferón-A) como compuesto de control estándar.

TABLA I: ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

#	TLR 7 humano (CME) µM	TLR 8 humano (CME) µM	HEK-ISRE luc (CME) µM
1	2.0	1.7	0.65
2	1.4	9.2	4.8

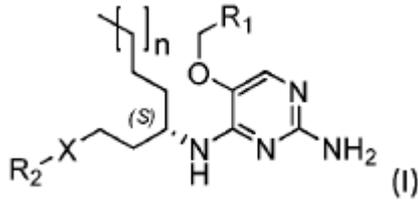
ES 2 733 361 T3

#	TLR 7 humano (CME) μM	TLR 8 humano (CME) μM	HEK-ISRE luc (CME) μM
E	3.9	10	ND

ND = no disponible. Ninguno de los compuestos presentó toxicidad hasta la concentración más elevada evaluada. Ninguno de los compuestos presentó actividad (CME > 25 μM) en el ensayo de sistemas celulares de cribado inverso HEK 293 NF-kB descrito anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



5

o una de sus sales, tautómeros, formas estereoisoméricas, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables, donde

X representa S, S=O o O=S=O,

R₁ es hidrógeno, alquilo (C₁₋₆), alcoxi (C₁₋₆) o arilo,

R₂ es alquilo (C₁₋₃) o cicloalquilo (C₃₋₆) y n = 1 o 2.

10

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

3. Un compuesto de fórmula (I) o una de sus sales, tautómeros, formas estereoisoméricas, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso como medicamento.

15

4. Un compuesto de fórmula (I) o una de sus sales, tautómeros, formas estereoisoméricas, solvatos o polimorfos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la reivindicación 1, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de infecciones víricas, trastornos inmunitarios o trastornos inflamatorios.