

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 999 323**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

C07D 249/08 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2019 PCT/CN2019/106687**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2020 WO20057604**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2019 E 19862693 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2024 EP 3854794**

54 Título: **Agonista de TLR8**

30 Prioridad:

19.09.2018 CN 201811094969

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2025

73 Titular/es:

**CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP
CO., LTD. (100.00%)
No. 369 Yuzhou South Road
Lianyungang, Jiangsu 222062, CN**

72 Inventor/es:

**CAI, ZHE;
SUN, FEI;
DING, CHARLES Z. y
CHEN, SHUHUI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 999 323 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

Agonista de TLR8

Campo técnico

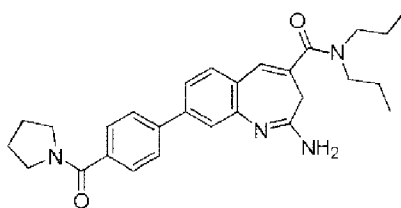
5 La presente solicitud se refiere a un agonista del receptor de tipo toll 8 (TLR8) novedoso y, en particular, se refiere a: un compuesto de fórmula (I), un estereoisómero o un tautómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; una composición farmacéutica que comprende el compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y el compuesto de fórmula (I), el estereoisómero o el tautómero del mismo o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo y la composición farmacéutica para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad sensible al agonismo de TLR8.

10 **Antecedentes**

Los receptores de tipo toll (TLR) son una clase importante de moléculas proteínicas implicadas en la inmunidad no específica (inmunidad innata), y también son un puente que vincula la inmunidad no específica y la inmunidad específica. Los TLR son proteínas no catalíticas transmembranarias individuales que se expresan principalmente en una diversidad de inmunocitos tales como células dendríticas, macrófagos, monocitos, células T, células B y células NK. Los TLR pueden reconocer moléculas con estructuras conservadas derivadas de microorganismos. Pueden reconocer los microorganismos y activar el organismo para generar respuestas de inmunocitos cuando los microorganismos atraviesan las barreras físicas del organismo, tales como la piel y la mucosa. Por ejemplo, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 reconocen principalmente estímulos extracelulares tales como lipopolisacárido, lipopéptido y flagelina de bacterias, mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 funcionan en endosomas celulares, tales como unión a sus ligandos después de fagocitosis y disolución de la envuelta y reconocimiento de ácidos nucleicos de microorganismos.

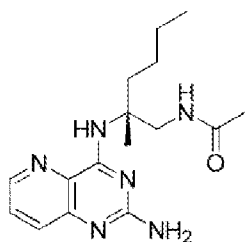
Entre los diferentes subtipos de TLR, TLR8 tiene funciones únicas: TLR8 se expresa principalmente en monocitos, macrófagos y células dendríticas mielocíticas. La ruta de señalización de TLR8 puede activarse por ARN monocatenarios bacterianos, agonistas micromoleculares y microARN. La activación de TLR8 da como resultado la producción de citocinas polares Th1 tales como IL-12, IL-18, TNF- α e IFN- γ , y diversos factores coestimuladores tales como CD80 y CD86. Estas citocinas pueden activar y amplificar respuestas inmunitarias innatas y adaptativas y proporcionar una pauta de tratamiento beneficiosa para enfermedades que implican antiviral, antiinfección, autoinmunidad, tumores y similares. Por ejemplo, con respecto a la hepatitis B, la activación de TLR8 en células presentadoras de antígeno y otros inmunocitos en el hígado puede activar citocinas tales como IL-12 que, a su vez, activa células T y células NK específicas que se reducen por el virus, reconstituyendo de este modo la inmunidad antiviral en el hígado.

El agonista selectivo de TLR8 VTX-2337 de VentiRX Pharmaceuticals se usa en primer lugar clínicamente para la evaluación de diferentes tumores, y el modo de administración de VTX-2337 es inyección subcutánea. Gilead Sciences informó de un agonista oral de TLR8 para el tratamiento de infección crónica por hepatitis B, que está actualmente en fase clínica II. Sin embargo, su estructura no se ha descrito todavía.

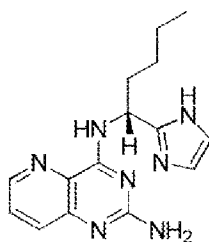


VTX-2337

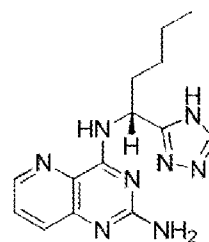
Se informó de una serie de agonistas de TLR8 en la patente WO2016141092 de Gilead Sciences, tal como la fórmula 1 con una CA_{50} de 0,02 μ M en agonizar TLR8 para inducir la producción de citocina específica IL-12p40 (datos citados de la tabla 1 del documento WO2016141092), en donde CA_{50} representa la concentración del compuesto correspondiente a la mitad del efecto agonista máximo. En la patente WO2016141092, también se informó de compuestos que contienen heterociclos nitrogenados de cinco miembros, tales como la fórmula 2 y la fórmula 3. Sin embargo, la fórmula 2 y la fórmula 3 tienen poca actividad en agonizar TLR8 para inducir la producción de citocina específica IL-12p40, siendo la CA_{50} de 21,5 μ M y 3,4 μ M respectivamente (datos citados de la tabla 1 del documento WO2016141092). La fórmula 1, la fórmula 2 y la fórmula 3 son los ejemplos 61, 55 y 56 descritos en el documento WO2016141092 respectivamente.



Fórmula 1



Fórmula 2

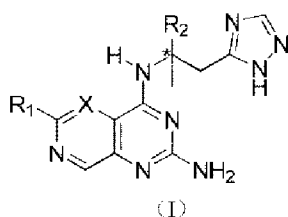


Fórmula 3

Compendio de la invención

El objeto de la invención es como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

- 5 En un aspecto, la presente solicitud proporciona un compuesto de fórmula (I), un estereoisómero o un tautómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



en donde,

el átomo de carbono con "*" puede ser un átomo de carbono quiral presente en forma de un enantiómero individual (*R*) o (*S*) o en forma enriquecida con un enantiómero;

- 10 X se selecciona del grupo que consiste en N y CH;

R₁ se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, CN, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆, -N(R_a) (R_b) y -O(R_c), estando el alquilo C₁₋₆ y cicloalquilo C₃₋₆ opcionalmente sustituidos con 1, 2 o 3 R_d;

R₂ es alquilo C₁₋₆, estando el alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R_e;

R_a, R_b, R_c, R_d y R_e se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OH, CN,

- 15 NH₂, CH₃, , estando el CH₃,

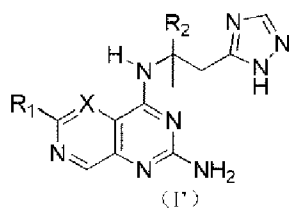
, opcionalmente sustituidos con 1, 2 o 3 R; y

cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en F, Cl, Br, I, OH, CN, NH₂, CH₃, ,

,

.

- 20 La presente descripción proporciona un compuesto de fórmula (I'), un estereoisómero o un tautómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



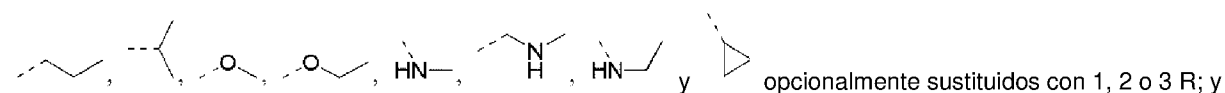
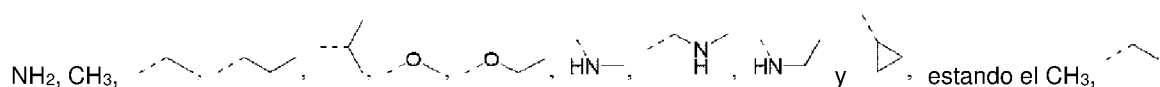
en donde,

X se selecciona del grupo que consiste en N y CH;

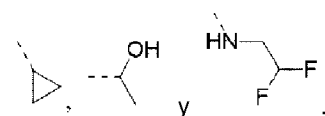
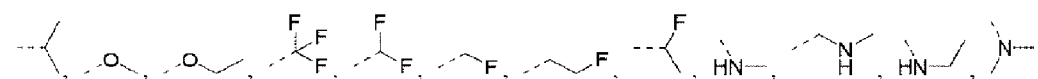
5 R₁ se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, CN, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆, -N(R_a) (R_b) y -O(R_c), estando el alquilo C₁₋₆ y cicloalquilo C₃₋₆ opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R_d;

R₂ es C₁₋₆ alquilo, estando el alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R_e;

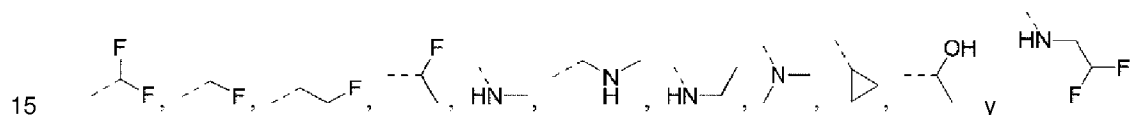
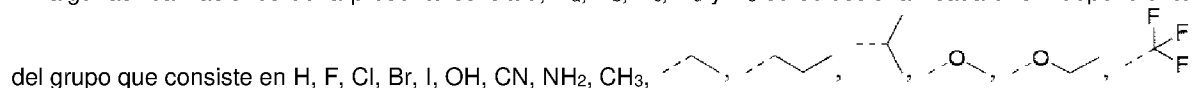
R_a, R_b, R_c, R_d y R_e se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OH, CN,



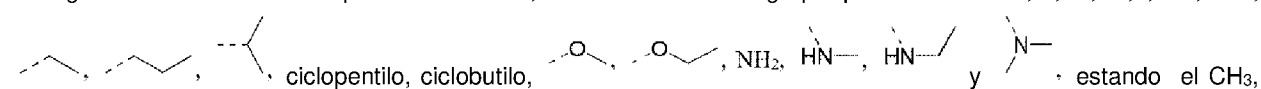
10 cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en F, Cl, Br, I, OH, CN, NH₂, CH₃,



En algunas realizaciones de la presente solicitud, R_a, R_b, R_c, R_d y R_e se seleccionan cada uno independientemente



En algunas realizaciones de la presente solicitud, R₁ se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, CN, CH₃,

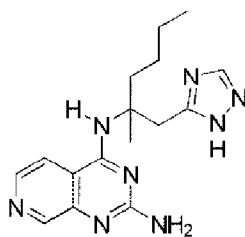


20 En algunas realizaciones de la presente solicitud, R₁ se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, CH₃ y

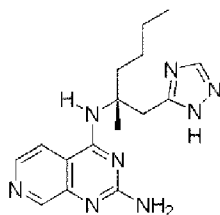
En algunas realizaciones de la presente solicitud, R₂ se selecciona del grupo que consiste en , y , estando el , y opcionalmente sustituidos con 1, 2 o 3 R_e.





En algunas realizaciones de la presente invención, R₂ es .











25 En un aspecto adicional, la presente solicitud también proporciona un compuesto de la fórmula siguiente, un estereoisómero o un tautómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
















En algunas realizaciones de la presente solicitud, se proporciona el compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionada de





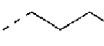
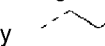



5 En algunas realizaciones de la presente solicitud, R_a , R_b , R_c , R_d y R_e se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OH, CN, NH_2 , CH_3 , , , , ,


, , , , , , , ,  y ; las otras variables se definen como anteriormente.

En algunas realizaciones de la presente solicitud, R_1 se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, CN, CH_3 ,

10 , , , , , , NH_2 , ,  y , estando el CH_3 , , ,  y  opcionalmente sustituidos con 1, 2 o 3 R_d .

En algunas realizaciones de la presente solicitud, R_1 se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, CH_3 y ; las otras variables se definen como anteriormente.

15 En algunas realizaciones de la presente solicitud, R_2 se selecciona del grupo que consiste en ,  y , estando el ,  y  opcionalmente sustituidos con 1, 2 o 3 R_e ; las otras variables se definen como anteriormente.

En algunas realizaciones de la presente invención, R_2 es ; las otras variables se definen como anteriormente.

20 Algunas otras realizaciones de la presente solicitud pueden obtenerse mediante la combinación arbitraria de las variables anteriores.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica divulgada en la presente memoria comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 En otro aspecto, la presente solicitud proporciona el compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método de agonismo de TLR8, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita (preferiblemente un ser humano) una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 En otro aspecto, la presente solicitud proporciona el compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad sensible al agonismo de TLR8, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita (preferentemente un ser humano) una

cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En otro aspecto, la presente solicitud proporciona la composición farmacéutica descrita en la presente memoria para su uso en un método de agonismo de TLR8, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica.

En otro aspecto, la presente solicitud proporciona la composición farmacéutica descrita en la presente memoria para su uso en un método para tratar una enfermedad sensible al agonismo de TLR8.

En algunas realizaciones de la presente solicitud, la enfermedad sensible al agonismo de TLR8 es infección vírica.

En algunas realizaciones de la presente solicitud, la infección vírica es infección por el virus de la hepatitis B (VHB).

10 Efectos técnicos

15 El compuesto descrito en la presente memoria tiene actividad agonista significativa de TLR8. El compuesto descrito en la presente memoria presenta actividad agonista deseable y selectividad específica por TLR8. El compuesto descrito en la presente memoria presenta actividad deseable para inducir citocinas específicas de la ruta de TLR8 (IL-12p40, IFN- γ). El estudio farmacocinético en ratones muestra que el compuesto descrito en la presente memoria tiene una biodisponibilidad oral y una exposición del fármaco moderadas y, por tanto, la administración oral es factible. El agonista de TLR8 es un inmunomodulador, y su exposición excesiva puede dar como resultado una sobreactivación inmunitaria del organismo, lo que da lugar a efectos secundarios impredecibles.

Definiciones y descripción

20 A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y expresiones que se usan en la presente memoria pretenden tener los siguientes significados. Un término o expresión particular, a menos que se defina específicamente de otro modo, no debe considerarse incierto o poco claro, sino que debe interpretarse según su significado común. Cuando se hace referencia a un nombre comercial, se pretende hacer referencia a su producto comercial correspondiente o a su ingrediente activo.











25 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se usa en la presente memoria para aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del criterio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones, y acordes con una relación de beneficio/riesgo razonable.

30 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal del compuesto descrito en la presente memoria, que se prepara a partir del compuesto que tiene sustituyentes particulares descritos en la presente memoria y un ácido o base relativamente atóxico. Cuando el compuesto descrito en la presente memoria contiene un grupo funcional relativamente ácido, se puede obtener una sal de adición de base al poner en contacto la forma neutra de dicho compuesto con una cantidad suficiente de una base en una solución pura o un disolvente inerte adecuado. Cuando el compuesto descrito en la presente memoria contiene un grupo funcional relativamente básico, se puede obtener una sal de adición de ácido al poner en contacto la forma neutra de dicho compuesto con una cantidad suficiente de un ácido en una solución pura o un disolvente inerte adecuado. Ejemplos de sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable incluyen sales de ácido inorgánico o sales de ácido orgánico.

35 Las sales farmacéuticamente aceptables descritas en la presente memoria pueden sintetizarse a partir de un compuesto original que tiene un grupo ácido o básico mediante métodos químicos convencionales. En general, dicha sal puede prepararse haciendo reaccionar los compuestos en forma de ácido o base libre con una cantidad estequiométrica de una base o ácido apropiado en agua o un disolvente orgánico o una mezcla de los dos.

40 Los términos "opcional" u "opcionalmente" significan que el acontecimiento o circunstancia descrito posteriormente puede producirse, pero no necesariamente. La descripción incluye casos donde se produce el acontecimiento o circunstancia y casos donde no lo hace. Por ejemplo, si un etilo está opcionalmente sustituido con halógeno, significa que el etilo puede estar sin sustituir (CH_2CH_3), monosustituido (por ejemplo, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$), polisustituido (por ejemplo, CHFCH_2F , CH_2CHF_2 y similares) o completamente sustituido (CF_2CF_3). Los expertos en la técnica entenderán que para cualquier grupo que comprenda uno o más sustituyentes, no se introduce ninguna sustitución o patrón de sustitución que pueda no existir o no pueda sintetizarse espacialmente. Los expertos en la técnica entenderán que cuando un grupo está sustituido con múltiples sustituyentes, el número de sustituyentes puede ser 2, 3, 4, 5 o más, estando sustituidos hasta todos los sitios donde pueda producirse sustitución. Por ejemplo, cuando el etilo está sustituido con múltiples átomos de F, el número de átomos de F puede ser 2, 3, 4 o 5.

50 " C_{m-n} " usado en la presente memoria significa que la porción tiene un número entero de átomos de carbono en el intervalo dado. Por ejemplo, " C_{1-6} " significa que el grupo puede tener 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, 4 átomos de carbono, 5 átomos de carbono o 6 átomos de carbono.

- Los compuestos descritos en la presente memoria pueden tener una forma geométrica o estereoisomérica específica. Todos estos compuestos se contemplan en la presente memoria, incluyendo isómeros *cis* y *trans*, enantiómeros (-) y (+), enantiómeros (*R*) y (*S*), diastereoisómeros, isómeros (*D*), isómeros (*L*) y mezclas racémicas y otras mezclas de los mismos, tal como una mezcla enriquecida en un enantiómero o diastereoisómero, de los que todos están incluidos dentro del alcance de la presente solicitud. Sustituyentes tales como alquilo pueden tener un átomo de carbono asimétrico adicional. Todos estos isómeros y mezclas de los mismos están incluidos dentro del alcance de la presente solicitud.
- A menos que se indique lo contrario, la expresión "enantiómero" o "isómero óptico" se refiere a estereoisómeros que son imágenes especulares entre sí.
- A menos que se indique lo contrario, la expresión "isómero *cis-trans*" o "isómero geométrico" resulta de la incapacidad de un enlace sencillo de un átomo de carbono del anillo o un doble enlace de rotar libremente.
- A menos que se indique lo contrario, el término "diastereoisómero" se refiere a estereoisómeros en los que cada molécula tiene dos o más centros quirales y no son imágenes especulares entre sí.
- A menos que se indique lo contrario, "(*D*)" o "(+)" significa dextrorrotación, "(*L*)" o "(-)" significa levorrotación, y "(*DL*)" o "(±)" significa racemización.
- A menos que se indique lo contrario, la configuración absoluta de un centro estereogénico se representa por un enlace en cuña rellena () y un enlace en cuña discontinua () y la configuración relativa de un centro estereogénico se representa por un enlace recto relleno () y un enlace discontinuo recto (). Una línea ondulada () representa un enlace en cuña rellena () o un enlace cuña discontinua () o una línea ondulada () representa un enlace recto relleno () y un enlace discontinuo recto ()
- Los compuestos descritos en la presente memoria pueden estar presentes en forma particular. A menos que se indique lo contrario, la expresión "tautómero" o "forma tautomérica" significa que diferentes isómeros funcionales están en equilibrio dinámico a temperatura ambiente y pueden convertirse rápidamente entre sí. Si son posibles tautómeros (por ejemplo, en solución), se puede conseguir el equilibrio químico de los tautómeros. Por ejemplo, un tautómero protónico, también conocido como tautómero prototrópico, incluye la interconversión por transferencia de protones, tal como isomerización ceto-enol e isomerización imina-enamina. Un isómero de valencia incluye la interconversión por recombinación de algunos electrones de unión. Un ejemplo específico de la tautomerización ceto-enol es la interconversión entre tautómeros pentano-2,4-diona y 4-hidroxipent-3-en-2-ona.
- El término "isómero" descrito en la presente memoria incluye estereoisómeros, isómeros *cis-trans* y tautómeros.
- A menos que se indique lo contrario, la expresión "enriquecido con un isómero", "enriquecido con isómero", "enriquecido con un enantiómero" o "enriquecido con enantiómero" significa que el contenido de uno de los isómeros o enantiómeros es menor del 100 % y mayor o igual a un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 %.
- A menos que se indique lo contrario, la expresión "exceso isomérico" o "exceso enantiomérico" se refiere a la diferencia entre los porcentajes relativos de dos isómeros o enantiómeros. Por ejemplo, si el contenido de un isómero o enantiómero es de un 90 % y el contenido del otro isómero o enantiómero es de un 10 %, el exceso isomérico o enantiomérico (valor ee) es de un 80 %.
- Los isómeros ópticamente activos (*R*) y (*S*), o isómeros *D* y *L* pueden prepararse mediante síntesis quiral o reactivos quirales u otras técnicas convencionales. Si se va a obtener un tipo de enantiómero de determinado compuesto descrito en la presente memoria, el enantiómero puro deseado se puede preparar por síntesis asimétrica o derivatización usando un auxiliar quiral, en donde la mezcla diastereoisomérica resultante se separa y el grupo auxiliar se escinde. Alternativamente, cuando la molécula contiene un grupo funcional básico (tal como amino) o un grupo funcional ácido (tal como carboxilo), el compuesto reacciona con un ácido o base ópticamente activo apropiado para formar una sal del diastereoisómero, que luego se somete a resolución diastereoisomérica a través de métodos convencionales en la técnica para obtener el enantiómero puro. Además, el enantiómero y el diastereoisómero se aíslan generalmente a través de cromatografía usando una fase estacionaria quiral, opcionalmente en combinación con derivatización química (por ejemplo, carbamato generado a partir de amina).
- El compuesto descrito en la presente memoria puede contener una proporción no natural de isótopo atómico en uno o más de los átomos que constituyen el compuesto. Por ejemplo, el compuesto puede marcarse con un radioisótopo, tal como tritio (³H), yodo-125 (¹²⁵I) o C-14 (¹⁴C). Para otro ejemplo, el hidrógeno puede sustituirse por deuterio para formar un fármaco deuterado, y el enlace formado por deuterio y carbono es más firme que el formado por hidrógeno y carbono comunes. En comparación con un fármaco no deuterado, el fármaco deuterado tiene las ventajas de un efecto secundario tóxico reducido, estabilidad aumentada, eficacia potenciada, semivida biológica prolongada y similares. Todas las variaciones isotópicas del compuesto descrito en la presente memoria, sean radiactivas o no, están incluidas dentro del alcance de la presente solicitud. "Opcional" u "opcionalmente" significa que el acontecimiento

o circunstancia descrito posteriormente puede producirse, pero no necesariamente, y la descripción incluye casos donde el acontecimiento o circunstancia se produce y casos donde no se produce.

5 El término "sustituido" significa que uno o más átomos de hidrógeno en un átomo específico están sustituidos con uno o más sustituyentes que pueden incluir deuterio y variantes de hidrógeno, siempre que la valencia del átomo específico sea normal y el compuesto sustituido sea estable. Cuando el sustituyente es un oxígeno (es decir, =O), significa que dos átomos de hidrógeno están sustituidos. La sustitución con oxígeno no se produce en grupos aromáticos. La expresión "opcionalmente sustituido" significa que un átomo puede estar sustituido o no con un sustituyente. A menos que se especifique lo contrario, el tipo y número del sustituyente puede ser arbitrario siempre que se pueda conseguir químicamente.

10 Cuando cualquier variable (por ejemplo, R) aparece más de una vez en la constitución o estructura de un compuesto, la definición de la variable en cada caso es independiente. Por tanto, por ejemplo, si un grupo está sustituido con 0-2 R, el grupo puede estar opcionalmente sustituido con dos R como máximo, y la definición de R en cada caso es independiente. Además, una combinación de un sustituyente y/o una variante del mismo es permisible solo si la combinación puede dar como resultado un compuesto estable.

15 A menos que se especifique lo contrario, la expresión "alquilo C₁₋₆" se refiere a un grupo de hidrocarburo saturado lineal o ramificado que contiene de 1 a 6 átomos de carbono. El alquilo C₁₋₆ incluye alquilo C₁₋₄, C₁₋₃, C₁₋₂, C₂₋₆, C₂₋₄, C₆, C₅ y similares; puede ser monovalente (por ejemplo, metilo), divalente (por ejemplo, metileno) o polivalente (por ejemplo, metenilo). Ejemplos de alquilo C₁₋₆ incluyen, pero no se limitan a, metilo (Me), etilo (Et), propilo (incluyendo *n*-propilo e isopropilo), butilo (incluyendo *n*-butilo, isobutilo, *s*-butilo y *t*-butilo), pentilo (incluyendo *n*-pentilo, isopentilo y neopentilo), hexilo y similares.

20 A menos que se especifique lo contrario, "cicloalquilo C₃₋₆" se refiere a un grupo de hidrocarburo cíclico saturado que consiste en 3 a 6 átomos de carbono, incluyendo sistemas de anillo monocíclicos y bicíclicos. El cicloalquilo C₃₋₆ incluye cicloalquilo C₃₋₅, cicloalquilo C₄₋₅, cicloalquilo C₅₋₆ y similares, y puede ser monovalente, divalente o polivalente. Ejemplos de cicloalquilo C₃₋₆ incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares.

25 La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla que consiste en uno o más de los compuestos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos descritos en la presente memoria y un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica está destinada a facilitar la administración del compuesto a una entidad orgánica.

30 La expresión "excipientes farmacéuticamente aceptables" se refiere a aquellos que no tienen un efecto irritante significativo sobre una entidad orgánica y no alteran la actividad biológica y las propiedades del compuesto activo. Los excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como carbohidratos, ceras, polímeros solubles en agua y/o hinchables en agua, material hidrófilo o hidrófobo, gelatina, aceite, disolvente y agua.

El término "tratar" significa administrar el compuesto o formulación descrito en la presente memoria para mejorar o eliminar una enfermedad o uno o más síntomas asociados con la enfermedad, e incluye:

35 (i) inhibir una enfermedad o patología, es decir, detener su desarrollo; y

(ii) aliviar una enfermedad o patología, es decir, provocar su regresión.

40 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto descrito en la presente memoria para (i) tratar una enfermedad, afección o trastorno específico, o (ii) aliviar, mejorar o eliminar uno o más síntomas de una enfermedad, afección o trastorno específico. La cantidad del compuesto descrito en la presente memoria que compone la "cantidad terapéuticamente eficaz" varía dependiendo del compuesto, la patología y su gravedad, la pauta de administración y la edad del mamífero a tratar, pero los expertos en la técnica pueden determinarla de forma rutinaria según su conocimiento y la presente descripción.

45 El término "prevenir" significa administrar el compuesto o formulación descrito en la presente memoria para prevenir una enfermedad o uno o más síntomas asociados con la enfermedad, e incluye: prevenir la aparición de la enfermedad o patología en un mamífero, particularmente cuando dicho mamífero está predispuesto a la patología, pero todavía no se ha diagnosticado que la tenga.

En esta solicitud se usan las siguientes abreviaturas:

Pd/C	Catalizador de Pd/C, que contiene paladio al 10 % en peso
DCM	Diclorometano
THF	Tetrahidrofurano
Boc	<i>Terc</i> -butiloxicarbonilo, un grupo protector de amina
Cbz	Benciloxicarbonilo, un grupo protector de amina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
TFA	Ácido trifluoroacético
PE	Éter de petróleo

DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
HOAc	Ácido acético
Trt	Trifenilmetilo
CbzCl	Cloroformiato de bencilo
DIPEA	Diisopropiletilamina
SiO ₂	Polvo de gel de sílice de malla 100-200, para cromatografía en columna
psi	Fuerza de libra/pulgada cuadrada, unidad de presión
<i>p p</i> -HPLC	Cromatografía de líquidos preparativa de alto rendimiento, para la purificación de compuestos

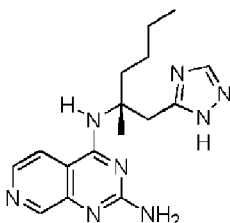
5 Los disolventes usados en la presente memoria están disponibles comercialmente y no requieren purificación adicional. La reacción se realiza generalmente en un disolvente anhidro en atmósfera de nitrógeno. Los datos de resonancia magnética nuclear de protones se registran en un espectrómetro Bruker Avance III 400 (400 MHz) y los desplazamientos químicos se presentan como ppm abajo de tetrametilsilano. Los espectros de masas se determinan en una Agilent 1200 de serie plus 6110 (y 1956A). El LC/MS o Shimadzu MS incluye un detector DAD: SPD-M20A (LC) y Shimadzu Micromass 2020. El espectrómetro de masas está equipado con una fuente de iones de electropulverización (ESI) que funciona en modo positivo o negativo.

10 El sistema Shimadzu LC20AB equipado con un tomamuestras automático Shimadzu SIL-20A y un detector DAD Shimadzu: SPD-M20A se usó para el análisis de cromatografía de líquidos de alto rendimiento con una columna cromatográfica Xtimate C18 (relleno 3m, especificación: 2,1 × 300 mm).

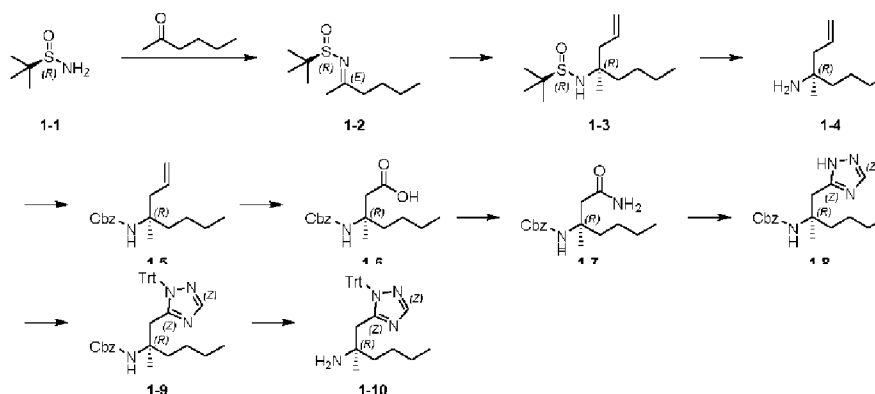
Realizaciones específicas

15 La presente solicitud se describe en detalle a continuación a modo de ejemplos. Sin embargo, esto no limita desfavorablemente de ninguna manera el alcance de la presente solicitud que se define por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1



Preparación del compuesto intermedio 1-10:



20 Etapa A: el compuesto 1-1 (50 g, 412,54 mmol) y titanato de tetraetilo (94,10 g, 412,54 mmol, 85,55 ml) se disolvieron en THF (500 ml) a 20-30 °C, y a la solución se le añadió 2-hexanona (41,32 g, 412,54 mmol, 51,01 ml). La mezcla de reacción se calentó hasta 65 °C y se agitó durante 48 horas, y la mezcla de reacción resultante se usó directamente en la siguiente etapa.

25 Etapa B: la mezcla de reacción de la etapa A se enfrió hasta temperatura ambiente, se complementó con THF (1000 ml), después se le añadió bromuro de alilo (196,33 g, 1,62 mol) y se le añadió lentamente polvo de cinc (53,06 g, 811,43 mmol) en porciones. La mezcla de reacción se agitó a 20-30 °C durante 12 horas en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se filtró a través de diatomita, y al filtrado se le añadió salmuera saturada (100 ml), se agitó y

se filtró a través de diatomita. El filtrado resultante se secó con un evaporador rotatorio. El residuo se disolvió en acetato de etilo (100 ml). La fase orgánica separada se lavó con salmuera saturada (300 ml × 1), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, PE/EtOAc = de 15/1 a 5/1) para dar el compuesto 1-3. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,96-5,75 (m, 1H), 5,23-5,08 (m, 2H), 3,20 (s, 1H), 2,39-2,20 (m, 2H), 1,74 (s a, 1H), 1,56-1,42 (m, 2H), 1,40-1,15 (m, 14H), 0,96-0,86 (m, 3H).

Etapa C: el compuesto 1-3 (15 g, 61,12 mmol) se disolvió en metanol (150 ml), y la solución se enfrió hasta 0 °C y se le añadió lentamente una solución en dioxano de ácido clorhídrico (4 M, 91,68 ml) a 0-20 °C. La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró directamente a presión reducida para dar el compuesto 1-4.

Etapa D: el compuesto 1-4 (clorhidrato, 13 g, 73,15 mmol) y bicarbonato de sodio (55,31 g, 658,36 mmol) se disolvieron en dioxano (90 ml) y H₂O (60 ml) y la solución se enfrió hasta 0 °C y después se le añadió lentamente CbzCl (74,87 g, 438,91 mmol, 62,40 ml) gota a gota. La mezcla de reacción se calentó hasta 20-30 °C, se agitó durante 2 horas y se extrajo con acetato de etilo (100 ml × 2). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera saturada (150 ml × 1), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un producto en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, PE/EtOAc = de 1/0 a 100/1) para dar el compuesto 1-5. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,30-7,26 (m, 5H), 5,76-5,62 (m, 1H), 5,08-4,91 (m, 4H), 2,47-2,34 (m, 1H), 2,32-2,20 (m, 1H), 1,72-1,57 (m, 1H), 1,50-1,42 (m, 1H), 1,30-1,10 (m, 7H), 0,76-0,76 (m, 1H), 0,76-0,76 (m, 1H), 0,82 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H).

Etapa E: el compuesto 1-5 (20,8 g, 75,53 mmol) se disolvió en acetonitrilo (100 ml), H₂O (150 ml) y tetracloruro de carbono (100 ml), y la solución se enfrió hasta 0 °C y se le añadió lentamente periyodato de sodio (64,62 g, 302,12 mmol), seguido de la adición de tricloruro de rutenio trihidrato (394,99 mg, 1,51 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta 25 °C y se agitó durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de diatomita y se extrajo con DCM (200 ml × 1). La fase orgánica se lavó con solución acuosa saturada de sulfato de sodio (200 ml × 1) y salmuera saturada (200 ml × 1) secuencialmente, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar el compuesto 1-6 en bruto, que se usó directamente en la siguiente etapa. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,40-7,35 (m, 5H), 5,19 (s, 1H), 5,08 (s, 2H), 2,89 (d a, *J* = 14,5 Hz, 1H), 2,69 (d a, *J* = 14,4 Hz, 1H), 1,90-1,77 (m, 1H), 1,74-1,62 (m, 1H), 1,43-1,20 (m, 7H), 0,90 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

Etapa F: el compuesto 1-6 (20 g, 68,18 mmol) y trietilamina (10,35 g, 102,26 mmol, 14,23 ml) se disolvieron en THF (250 ml), y a la solución se le añadió cloroformiato de isobutilo (9,78 g, 71,59 mmol, 9,40 ml) gota a gota a -10 °C en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a -10-0 °C. A la mezcla de reacción se le añadió lentamente agua amoniacal (63,70 g, 454,41 mmol, 70 ml, 25 %) y se agitó a 0-5 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se extrajo con acetato de etilo (200 ml × 1). La fase orgánica se lavó con salmuera saturada (100 ml × 2), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, PE/EtOAc = de 10/1 a 1/1) para dar el compuesto 1-7. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,41-7,28 (m, 5H), 5,62 (s a, 1H), 5,30-5,12 (m, 2H), 5,11-5,01 (m, 2H), 2,76 (d, *J* = 13,2 Hz, 1H), 2,44 (d, *J* = 13,3 Hz, 1H), 1,85-1,74 (m, 1H), 1,73-1,62 (m, 3H), 1,39-1,29 (m, 5H), 0,90 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H). LCMS (ESI) *m/z*: 293,3 [M+H]⁺.

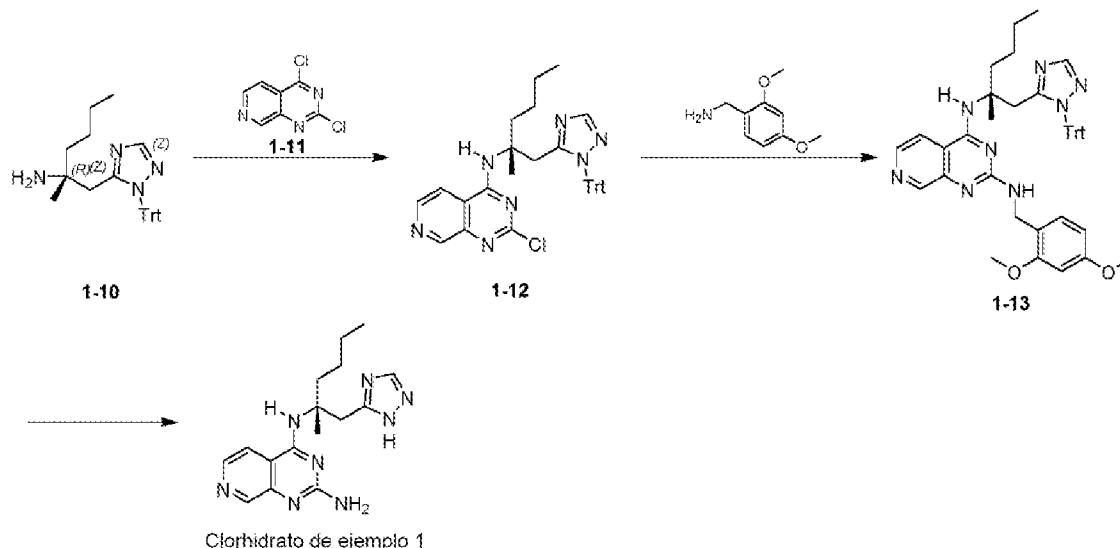
Etapa G: el compuesto 1-7 (15,34 g, 52,47 mmol) y dimetil acetal de *N,N*-dimetilformamida (134,55 g, 1,13 mol, 150 ml) se agitaron a 120 °C durante 2 horas, se concentraron a presión reducida y se disolvieron en ácido acético (250 ml) y a la solución se le añadió lentamente hidrato de hidrazina (25,75 g, 504,09 mmol, 25 ml, 98 %). La mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 2 horas en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se le añadió H₂O (400 ml) y se extrajo con DCM (200 ml × 2). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera saturada (200 ml × 2), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el compuesto 1-8 en bruto. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,95 (s, 1H), 7,43-7,29 (m, 5H), 5,08 (s, 2H), 4,90 (s a, 1H), 3,42 (d a, *J* = 13,9 Hz, 1H), 3,12 (d, *J* = 14,3 Hz, 1H), 1,87-1,77 (m, 1H), 1,68-1,58 (m, 1H), 1,41-1,17 (m, 7H), 0,90 (t a, *J* = 6,5 Hz, 3H). LCMS (ESI) *m/z*: 317,2 [M+H]⁺.

Etapa H: el compuesto 1-8 (15,20 g, 48,04 mmol) y DIPEA (12,42 g, 96,08 mmol, 16,74 ml) se disolvieron en DCM (160 ml), y a la solución se le añadió lentamente trifetilclorometano (20,09 g, 72,06 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 2 horas. A la mezcla de reacción se le añadió H₂O (100 ml), se le añadió ácido clorhídrico diluido 2 N para ajustar el pH (7-8), y se extrajo con DCM (100 ml × 1). La fase orgánica se lavó con salmuera saturada (100 ml × 2), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, PE/EtOAc = de 20/1 a 5/1) para dar el compuesto 1-9. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,89 (s, 1H), 7,37-7,27 (m, 14H), 7,18-7,07 (m, 6H), 5,72 (s a, 1H), 5,16-4,93 (m, 2H), 3,07 (d, *J* = 14,2 Hz, 1H), 2,90 (d, *J* = 14,2 Hz, 1H), 1,80-1,61 (m, 4H), 1,33 (s, 3H), 0,90-0,84 (m, 3H). LCMS (ESI) *m/z*: 559,3 [M+H]⁺.

Etapa I: el compuesto 1-9 (12,75 g, 22,82 mmol) se disolvió en isopropanol (300 ml), y a la solución se le añadió Pd/C (6 g) en atmósfera de nitrógeno. La suspensión se desgasificó al vacío y se purgó con hidrógeno tres veces, y se agitó a 25 °C durante 16 horas en atmósfera de hidrógeno (103,42 kPa (15 psi)). La mezcla de reacción se filtró a través de diatomita y se lavó con DCM (300 ml), y el filtrado se concentró a presión reducida para dar el compuesto 1-10. RMN

de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,91 (s, 1H), 7,37-7,28 (m, 9H), 7,17-7,11 (m, 6H), 2,87 (s, 2H), 1,45-1,24 (m, 6H), 1,12 (s, 3H), 0,92-0,84 (m, 3H). LCMS (ESI) m/z : 425,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Síntesis del ejemplo 1:



5 Etapa A: el compuesto 1-10 (1,91 g, 4,50 mmol) y el compuesto 1-11 (900 mg, 4,50 mmol) se disolvieron en THF (9 ml), y a la solución se le añadió DIPEA (9,00 mmol, 1,57 ml). La mezcla de reacción se agitó a 70 °C durante 3 horas en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para dar el compuesto 1-12 en bruto. LCMS (ESI) m/z : 588,42 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

10 Etapa B: el compuesto 1-12 en bruto (3,60 g, 6,12 mmol) y 2,4-dimetoxibencilamina (3,01 mg, 18,00 mmol, 2,71 ml) se disolvieron en 1,4-dioxano (30 ml), y a la solución se le añadió DIPEA (8,99 mmol, 1,57 ml) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 12 horas. A la mezcla de reacción se le añadió agua (20 ml) y acetato de etilo (50 ml) para la separación de líquidos. La fase orgánica se lavó con salmuera saturada (20 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para dar un producto en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (SiO_2 , DCM/MeOH = de 100/1 a 15/1) para dar el compuesto 1-13. LCMS (ESI) m/z : 719,7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

15 Etapa C: el compuesto 1-13 (2,00 g, 2,78 mmol) y trietilsilano (970,50 mg, 8,35 mmol, 1,33 ml) se disolvieron en TFA (41,81 ml), y la solución se agitó a 28 °C durante 12 horas. La mezcla de reacción se concentró directamente a presión reducida y se purificó mediante *p*-HPLC (columna: Phenomenex luna C18 250 × 50 mm × 10 μm ; fluidez: [agua (HCl al 0,05 %)-acetonitrilo]; % de acetonitrilo: 10 %-40 %, 28 min, 50 % min) para dar el clorhidrato de ejemplo 1. RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ 9,15 (s, 1H), 8,90 (s, 1H), 8,59 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H), 8,26 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,11 (d, $J = 14,8$ Hz, 1H), 3,53 (d, $J = 14,9$ Hz, 1H), 2,60 (dt, $J = 4,1, 12,8$ Hz, 1H), 1,79 (dt, $J = 4,2, 12,8$ Hz, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,52-1,19 (m, 4H), 0,92 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H). LCMS (ESI) m/z : 327,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ejemplo experimental 1: Cribado para determinar la actividad de unión al receptor *in vitro* del receptor 7 de tipo toll (TLR7) humano y el receptor 8 de tipo toll (TLR8) humano

25 Las líneas celulares HEK-Blue™ hTLR7 (n.º de catálogo: hkb-htlr7) y HEK-Blue™ hTLR8 (n.º de catálogo: hkb-htlr8) usadas en este experimento se adquirieron de InvivoGen. Las dos líneas celulares se construyeron mediante una línea celular 293 de riñón embrionario que cotransfecta de manera estable hTLR7 o hTLR8 e induce expresión del gen indicador de fosfatasa alcalina secretada (SEAP), en donde el gen indicador SEAP estaba regulado por un promotor de IFN- β . El promotor se fusionó con los sitios de unión de NF- κB y AP-1. El agonista de hTLR7 o hTLR8 puede activar NF- κB y AP-1 e inducir la expresión y secreción de SEAP. La actividad agonista del compuesto para los receptores hTLR7 y hTLR8 se identificó midiendo el nivel de expresión de SEAP usando reactivo QUANTI-Blue™.

Los procedimientos experimentales son como sigue:

35 1. Se añadió el compuesto a una placa celular en un gradiente de 3 veces, siendo las concentraciones finales 5000 nM, 1667 nM, 556 nM, 185 nM, 62 nM, 21 nM, 6,9 nM, 2,3 nM, 0,76 nM y 0,25 nM respectivamente, y se proporcionaron dos pocillos duplicados para cada concentración. Se añadió 1 μl de DMSO a cada pocillo de control negativo.

2. Las células cultivadas en un matraz T150 se extrajeron de una incubadora de CO_2 , y el sobrenadante del cultivo celular se desechó. Las células resultantes se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato de

Dulbecco (DPBS). Al matraz se le añadió aproximadamente 10 ml del medio de cultivo y se golpeó para desprender las células. La masa celular resultante se pipeteó suavemente de manera uniforme. Las células se contaron y la suspensión celular se ajustó a 500 000 células/ml con el medio de cultivo. Después se añadieron 100 µl de células diluidas (50 000 células/pocillo) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos que contenía el compuesto.

3. El compuesto y las células se incubaron en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 24 horas.

4. Ensayo de actividad sobre el compuesto: se añadieron 20 µl del sobrenadante celular inducido de cada pocillo a una placa de cultivo celular que contenía 180 µl de reactivo QUANTI-Blue™, y después de incubación a 37 °C durante 1 hora, se analizó la absorbancia a densidad óptica de 650 nm (DO₆₅₀) para cada pocillo usando un lector de microplacas multifuncional.

5. Ensayo de actividad sobre las células: se detectó la señal de luciferasa (URL) usando un lector de microplacas multifuncional según el proceso descrito en las instrucciones de ATPlite 1Step.

6. Análisis de datos: actividad del compuesto: se analizaron los valores de DO₆₅₀ usando un programa informático GraphPad Prism y las curvas de dosis-respuesta del compuesto se ajustaron para calcular los valores de CE₅₀ (concentración para la mitad del efecto máximo) para el compuesto.

Resultados experimentales: los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Compuesto de ensayo	CE ₅₀ de TLR8 humano (µM)	CE ₅₀ de TLR7 humano (µM)
Clorhidrato de ejemplo 1	0,003	33,33

Conclusión: el compuesto descrito en la presente memoria presenta actividad agonista de TLR8 deseable y, en términos de TLR8 y TLR7, tiene selectividad específica por TLR8.

Ejemplo experimental 2: Procedimiento experimental para leucocitos monomorfonucleares de sangre periférica

TLR8 es un receptor para que el sistema inmunitario innato detecte patógenos exógenos, y puede reconocer ARN monocatenario vírico exógeno y provocar la liberación de una serie de citocinas tales como TNF-α, IL-12, IFN-γ para provocar una respuesta inmunitaria antivírica; TLR7 es otro receptor para que el sistema inmunitario innato detecte patógenos exógenos y, cuando se activa, produce principalmente citocinas antivíricas tales como IFN-α. En este experimento, se usó un posible compuesto de agonista de TLR8 para estimular leucocitos monomorfonucleares de sangre periférica humana (hPBMC), y se midieron los niveles de TNF-α, IL-12p40, IFN-γ e IFN-α anteriores para reflejar la activación del compuesto sobre el receptor de TLR8 y su selectividad por TLR8/TLR7.

Los procedimientos experimentales son como sigue:

1. Se recogió sangre fresca de voluntarios sanos y se anticoaguló con un tubo de anticoagulación EDTA-K2 (n.º de catálogo: BD-8516542);

2. Las células hPBMC de la capa intermedia turbia se separaron después de centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll, y se lavaron dos veces con RPMI1640 (fuente: Gibco, n.º de catálogo: 224400-089) que contenía suero al 10 %, y el medio de cultivo se resuspendió hasta 10 ml. Después de que las células se contaran con contador de células Vi-cell, la concentración de la suspensión celular se ajustó a 2×10^6 /ml;

3. El compuesto se disolvió en DMSO hasta 100 mM, y se diluyó hasta 50 mM y 2 mM con DMSO, que sirvieron como concentraciones iniciales. Después, las soluciones se diluyeron cada una secuencialmente en un gradiente de 3 veces (muestra a una concentración previa (5 µl) + DMSO (10 µl)) para obtener 8 gradientes. Las soluciones resultantes se sometieron respectivamente a dilución de 500 veces con el medio de cultivo para preparar las soluciones de trabajo del compuesto;

4. Se añadieron 100 µl de suspensión de hPBMC y 100 µl de solución de trabajo de compuesto a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U, siendo las concentraciones finales 2000 nM, 666,7 nM, 222,2 nM, 74,1 nM, 24,7 nM, 8,2 nM, 2,7 nM y 0,9 nM respectivamente, y se incubaron durante 24 horas. Después, los sobrenadantes se recogieron y se crioconservaron a -20 °C para la detección de citocinas TNF-α, IFN-γ e IL-12p40. El otro grupo de muestras de compuesto, siendo las concentraciones finales 50 µM, 16,7 µM, 5,6 µM, 1,9 µM, 0,6 µM, 0,2 µM, 0,1 µM y 0,02 µM respectivamente, se incubaron durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogieron y se crioconservaron a -20 °C para la detección de citocinas IFN-α;

5. Se detectaron IL-12p40, TNF-α e IFN-γ en el sobrenadante mediante matriz de microesferas citométricas de flujo (CBA); se detectó IFN-α en el sobrenadante celular mediante ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA).

6. Análisis de datos: actividad del compuesto: se analizaron los valores de CE₅₀ (concentración de para la mita del efecto máximo) usando un programa informático GraphPad Prism y las curvas de dosis-respuesta del compuesto se ajustaron para calcular los valores de CE₅₀ para el compuesto.

Resultados experimentales: los resultados se muestran en la tabla 2.

5 Tabla 2

Compuesto de ensayo	CE ₅₀ de IL-12p40 (nM)	CE ₅₀ de IFN-γ (nM)	CE ₅₀ de TNF-α (nM)	CE ₅₀ de IFN-α (nM)
Clorhidrato de ejemplo 1	26	29	105	2800

Conclusión: el compuesto descrito en la presente memoria tiene actividad de inducción deseable para las citocinas específicas de la ruta de TLR8 IL-12p40, TNF-α e IFN-γ, y actividad de inducción relativamente baja para la citocina específica de la ruta de TLR7 IFN-α, mostrando selectividad específica deseable para la activación de la ruta de TLR8.

10 Ejemplo experimental 3: Estudio farmacocinético en ratones

Este experimento pretendía evaluar el comportamiento farmacocinético del compuesto después de una sola inyección intravenosa o administración intragástrica en ratones. Inyección intravenosa: el compuesto de ensayo se preparó en una solución transparente de 0,5 mg/ml, siendo el vehículo DMSO al 5 %/hidroxiestearato de polietilenglicol-15 al 5 %/agua al 90 %; administración intragástrica: el compuesto de ensayo se preparó en una suspensión de 2 mg/ml, siendo el vehículo carboximetilcelulosa de sodio al 0,5 %/tween 80 al 0,2 %/agua al 99,3 %.

La concentración del compuesto de ensayo en plasma se determinó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Los tiempos de retención del compuesto y el patrón interno, las adquisiciones de cromatograma y las integrales de los cromatogramas se procesaron usando el programa informático Analyst (Applied Biosystems), y las cifras estadísticas de los datos se procesaron usando el programa informático Watson LIMS (Thermo Fisher Scientific) o Analyst (Applied Biosystems).

Las concentraciones en plasma se procesaron usando un modelo no compartimental de WinNonlin™ versión 6.3 (Pharsight, Mountain View, CA), un programa informático farmacocinético y los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando un método lineal-logarítmico trapezoidal.

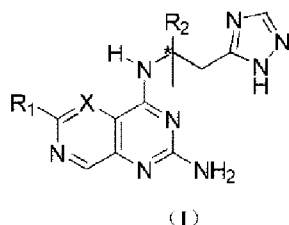
25 Los parámetros farmacocinéticos relacionados en los ratones a 1 mg/kg en inyección intravenosa y 5 mg/kg en administración intragástrica oral del clorhidrato de ejemplo 1 se muestran en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos relacionados en ratones

Inyección intravenosa (1 mg/kg)	Cl (ml/min/kg)	90,2
	Vdss (l/kg)	1,75
	t _{1/2} (hora)	0,25
	ABC _{0-último} (nM. h)	450
Administración intragástrica oral (5 mg/kg)	T _{máx} (hora)	0,5
	C _{máx} (nM)	421
	ABC _{0-último} (nM. h)	624
Biodisponibilidad (% F)		27,7

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I), un estereoisómero o un tautómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



5 en donde,

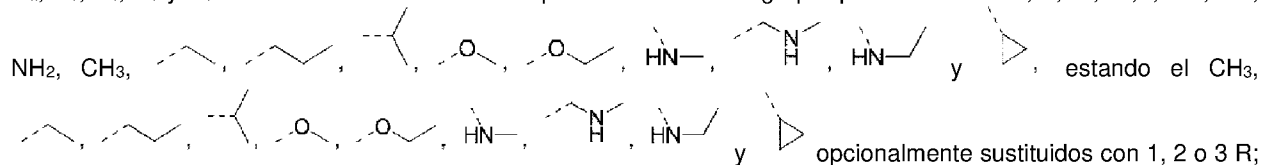
el átomo de carbono con "*" puede ser un átomo de carbono quiral presente en forma de un enantiómero individual (R) o (S) o en forma enriquecida con un enantiómero;

X se selecciona del grupo que consiste en N y CH;

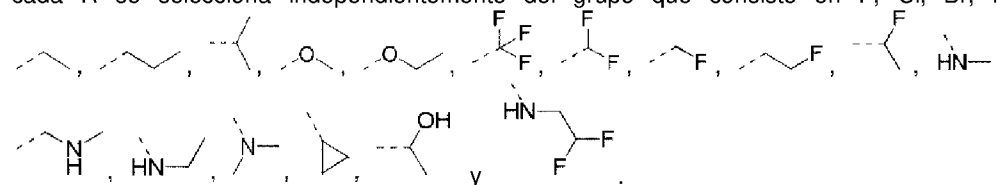
10 R₁ se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, CN, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₆, -N(R_a)(R_b) y -O(R_c), estando el alquilo C₁₋₆ y cicloalquilo C₃₋₆ opcionalmente sustituidos con 1, 2 o 3 R_d;

R₂ es alquilo C₁₋₆, estando el alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido con 1, 2 o 3 R_e;

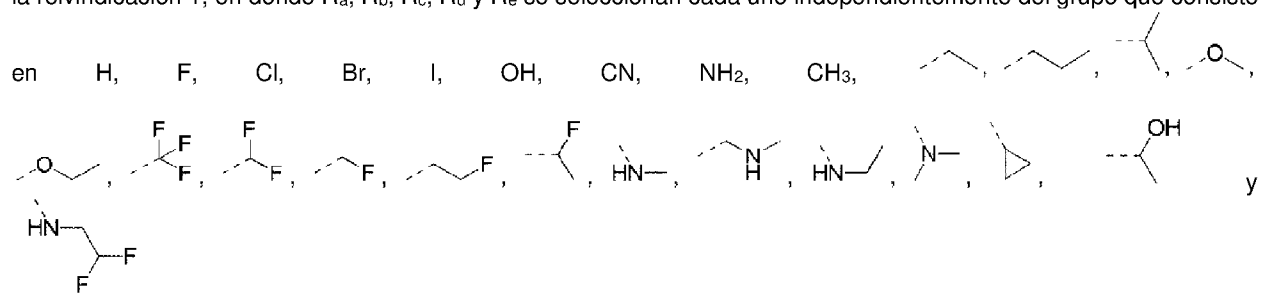
R_a, R_b, R_c, R_d y R_e se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, OH, CN,



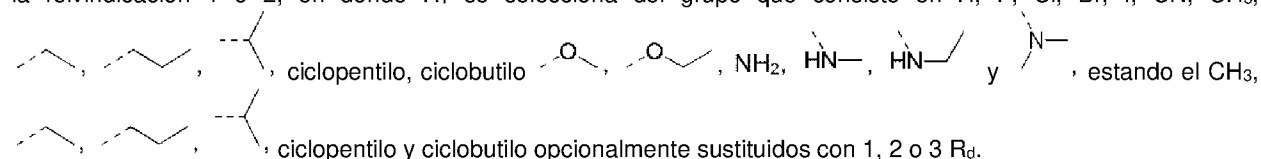
15 y cada R se selecciona independientemente del grupo que consiste en F, Cl, Br, I, OH, CN, NH₂, CH₃,









20 2. El compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 1, en donde R_a, R_b, R_c, R_d y R_e se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste




25 3. El compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 1 o 2, en donde R₁ se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, CN, CH₃,

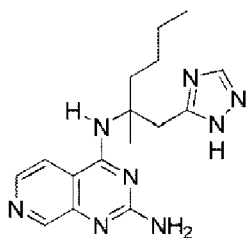


4. El compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 1 o 2, en donde R₁ se selecciona del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, CH₃ y .

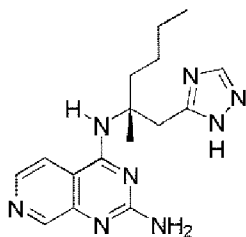
5. El compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 1 o 2, en donde R_2 se selecciona del grupo que consiste en ,  y , estando el ,  y  opcionalmente sustituidos con 1, 2 o 3 R_e .

5 6. El compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 5, en donde R_2 es .

7. Un compuesto de la fórmula siguiente, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,



10 8. El compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 7, seleccionado de



9. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

15 10. El compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un método de agonismo de TLR8, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 11. El compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad sensible al agonismo de TLR8.

12. El compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según la reivindicación 11, en donde la enfermedad sensible al agonismo de TLR8 es infección vírica.

13. El compuesto, el estereoisómero o el tautómero del mismo, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según la reivindicación 12, en donde la infección vírica es infección por el virus de la hepatitis B.

25 14. La composición farmacéutica según la reivindicación 9 para su uso en un método de agonismo de TLR8, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica.

30 15. La composición farmacéutica según la reivindicación 9 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad sensible al agonismo de TLR8, preferiblemente, la enfermedad sensible al agonismo de TLR8 es infección vírica y, más preferiblemente, la infección vírica es infección por el virus de la hepatitis B.