

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 917 887**

(51) Int. Cl.:

C07D 473/18 (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2015 PCT/IB2015/058774**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016 WO16075661**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2015 E 15797460 (1)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2022 EP 3218377**

(54) Título: **Derivados de adenina que son útiles en el tratamiento de enfermedades alérgicas u otras afecciones inflamatorias**

(30) Prioridad:

13.11.2014 US 201462079027 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2022

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

BAZIN-LEE, HELENE G. y
LI, YUFENG

(74) Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 917 887 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 adenina que son útiles en el tratamiento de enfermedades alérgicas u otras afecciones inflamatorias

- 5 Se realizaron aspectos de esta invención con apoyo del gobierno de los Estados Unidos de conformidad con el contrato de los NIH n.º HHSN272200900036C, el gobierno de los Estados Unidos puede tener ciertos derechos sobre la invención.

Antecedentes de la invención

10 La presente invención se refiere a compuestos, a composiciones que los contienen y a su uso terapéutico como adyuvantes de vacunas y en el tratamiento de diversos trastornos.

15 El sistema inmunitario innato reconoce los microbios por medio de un número limitado de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) codificados en la línea germinal que tienen varias características importantes.

20 Los receptores de tipo Toll (TLR) son una familia de PRR relacionados estructuralmente que detectan componentes microbianos sumamente conservados comunes a grandes clases de patógenos. Los TLR se expresan sobre células inmunitarias y, tras su activación, movilizan mecanismos de defensa dirigidos a eliminar los patógenos invasores. De los más de diez TLR conocidos que se han identificado en seres humanos, algunos parecen estar restringidos a los compartimentos citoplasmáticos e implicados en la detección de ácidos nucleicos no propios (TLR 3, 7, 8 y 9). Véase, por ejemplo, Akira *et al.*, Nat Rev Immunol 2004, 4, 499-511; O'Neill, *et al.*, Nat Rev Immunol 2013, 13, 453-460.

25 La activación de TLR regula rutas de señalización intracelular que conducen a la expresión de citocinas/quimiocinas inflamatorias e interferones de tipo I (IFN α / β), lo que puede conducir a la potenciación preferente de respuestas inmunitarias humorales específicas de antígeno y mediadas por células.

30 TLR7 y TLR8 son miembros del subgrupo de TLR (TLR 3, 7, 8 y 9) localizados en el compartimento endósómico de las células. TLR7 desempeña un papel clave en la defensa antiviral por medio del reconocimiento de ARNm (Diebold S.S. *et al.*, Science, 2004: 303, 1529-1531; y Lund J. M. *et al.*, PNAS, 2004: 101, 5598-5603). TLR7 tiene un perfil de expresión restringido en seres humanos y se expresa predominantemente por células B y células dendríticas plasmocitoides (pDC), y en un menor grado por monocitos. Las DC plasmocitoides son una población única de células dendríticas derivadas de tejido linfoide (normalmente el 0,2-0,8 % de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC)) y son las principales células productoras de interferón de tipo I que secretan altos niveles de interferón-alfa (IFN α) e interferón-beta (IFN β) en respuesta a infecciones virales (Liu Y-J, Annu. Rev. Immunol., 2005: 23, 275-306).

35 Se han descrito agonistas de molécula pequeña de TLR7 que pueden inducir citocinas en animales y en el hombre (Takeda K. *et al.*, Annu. Rev. Immunol., 2003: 21, 335-76). Los agonistas de TLR7 incluyen compuestos de imidazoquinolina tales como imiquimod y resiquimod, análogos de oxoadenina y también análogos de nucleósidos tales como loxoribina y 7-tia-8-oxoguanosina, que se sabe que inducen interferón alfa. La publicación de solicitud de 40 patente internacional número WO 2007/034882 (PCT/JP2006/318758; Dainippon Sumitomo Pharma Co. Ltd./AstraZeneca Aktiebolag) da a conocer ciertos compuestos de adenina identificados como útiles como medicamento.

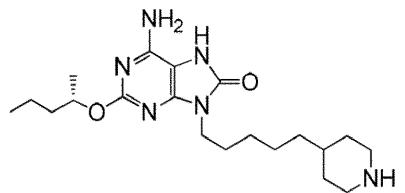
45 Se ha mostrado que ciertos compuestos derivados de adenina son inductores de interferón humano. Compuestos que inducen interferón humano pueden ser útiles como adyuvantes de vacunas, así como en el tratamiento de diversos trastornos, incluyendo enfermedades infecciosas, asma, cáncer, afecciones inflamatorias y enfermedades alérgicas. Por tanto, es deseable proporcionar compuestos que tengan selectividad y/o potencia por TLR7/8 y alta inducción relativa de citocinas.

50

Sumario de la invención

En un primer aspecto, se proporciona el compuesto 6-amino-9-[5-(4-piperidinil)pentil]-2-[(1S)-1-metilbutil]oxi]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona:

55



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- Se proporciona como aspecto adicional de la invención el compuesto 6-amino-9-[5-(4-piperidinil)pentil]-2-[(1S)-1-metilbutil]oxi]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia. Se apreciará que, cuando el compuesto 6-amino-9-[5-(4-piperidinil)pentil]-2-[(1S)-1-metilbutil]oxi]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se usa en terapia, se usa como agente terapéutico activo.
- Por tanto, se proporciona también el compuesto 6-amino-9-[5-(4-piperidinil)pentil]-2-[(1S)-1-metilbutil]oxi]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de enfermedades alérgicas u otras afecciones inflamatorias, enfermedades infecciosas o cáncer.
- Se proporciona también el compuesto 6-amino-9-[5-(4-piperidinil)pentil]-2-[(1S)-1-metilbutil]oxi]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de rinitis alérgica.
- Por tanto, se proporciona también el compuesto 6-amino-9-[5-(4-piperidinil)pentil]-2-[(1S)-1-metilbutil]oxi]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de asma.
- Se proporciona además una composición inmunogénica que comprende un antígeno o una composición antigénica y el compuesto 6-amino-9-[5-(4-piperidinil)pentil]-2-[(1S)-1-metilbutil]oxi]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- Se proporciona además una composición de vacuna que comprende un antígeno o una composición antigénica y el compuesto 6-amino-9-[5-(4-piperidinil)pentil]-2-[(1S)-1-metilbutil]oxi]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- La invención proporciona, en un aspecto adicional, una combinación que comprende el compuesto 6-amino-9-[5-(4-piperidinil)pentil]-2-[(1S)-1-metilbutil]oxi]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con al menos otro agente terapéuticamente activo.
- Se proporciona además una composición farmacéutica que comprende el compuesto 6-amino-9-[5-(4-piperidinil)pentil]-2-[(1S)-1-metilbutil]oxi]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.
- Se proporciona también un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende mezclar el compuesto 6-amino-9-[5-(4-piperidinil)pentil]-2-[(1S)-1-metilbutil]oxi]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con uno o más diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.
- El compuesto de la invención y las sales del mismo pueden prepararse mediante la metodología descrita en el presente documento.
- 40 Descripción de los dibujos**
- La figura 1 muestra gráficamente la respuesta a NFkB de (A) células HEK293-hTLR7 y (B) HEK293-hTLR8 tratadas durante 24 horas con los compuestos de oxoadenina 3a-3g; (C) muestra los valores de CE₅₀ de hTLR7 y hTLR8 para las oxoadeninas 3a-3g. Los números dentro de un círculo en el gráfico indican la longitud del ligador de carbono de cada compuesto.
- La figura 2 (A) muestra la inducción de TNFalfa en hPBMC y (B) la expresión de IL-6 en mDC después de la estimulación con los compuestos de oxoadenina 3a-g. El experimento se realizó por triplicado en hPBMC de tres donantes sanos diferentes. Los números dentro de un círculo indican la longitud del ligador de carbono de cada compuesto.
- La figura 3 muestra gráficamente la inducción de IFNalfa en hPBMC después de la estimulación con las oxoadeninas 3a-g.
- La figura 4 muestra gráficamente la respuesta a NFkB de (A) células HEK293-hTLR7 y (B) HEK293-hTLR8 tratadas durante 24 horas con los compuestos de oxoadenina 3b, 3f o 3x, o la imidazoquinolina CRX642.
- La figura 5 muestra gráficamente la inducción de TNFalfa a partir de PBMC humanas mediante estimulación con diferentes compuestos de oxoadenina (3b, 3f o 3x), o imidazoquinolina CRX642, o compuesto AGP CRX601.
- La figura 6 muestra gráficamente la inducción de IFN-alfa inducción en PBMC humanas mediante estimulación con diferentes compuestos de oxoadenina (3b, 3f o 3x) o AGP CRX601 o CRX642 (imidazoquinalina).
- La figura 7 muestra la inducción de IFNalfa en pDC de tres donantes diferentes, tal como se mide mediante ICS (tinción

de citocinas intracelulares), mediante estimulación con diferentes oxoadeninas (3b, 3f o 3x), a diferentes dosificaciones.

5 La figura 8A muestra gráficamente la inducción de IL-12p70 en PBMC humanas mediante diferentes oxoadeninas (3b, 3f o 3x) o AGP CRX601 (agonista de TLR4) o CRX642 (imidazoquinolina). La figura 8B muestra gráficamente la inducción de IL-12p70 en PBMC humanas mediante diferentes oxoadeninas (3b, 3f o 3x) en combinación con CRX601 (agonista de TLR4), o CRX642 (imidazoquinolina) en combinación con CRX601.

10 La figura 9 es el esquema I que muestra la síntesis del compuesto de oxoadenina 3x, un compuesto según la fórmula (I).

Descripción detallada de la invención

15 En el presente documento se describe la síntesis de compuestos de oxoadenina sustituidos en la posición C9 con un resto piperidinilalquilo, y que contienen un butoxilo o metilbutoxilo C2. La evaluación *in vitro* en células HEK293 transfectadas con TLR7 humano o TLR8 humano, y en PBMC humanas, indicó que la inducción de citocinas y selectividad/potencia de hTLR7/8 podrían modularse variando la longitud del ligador de carbono. Adicionalmente, se determinó que la introducción de un grupo metilo en el primer carbono del butoxilo C2 (para proporcionar metilbutoxilo) afectó a tanto a la actividad de TLR7 como a la de TLR8.

20 Se han descrito agonistas oligonucleótidos de TLR7 y TLR9, y agonistas de TLR7 basados en purina de molécula pequeña, que pueden inducir interferón alfa a partir de estos tipos de células en animales y en el hombre (Takeda K. *et al*, Annu. Rev. Immunol., 2003; 21, 335-76). Los agonistas de TLR7 incluyen compuestos de imidazoquinolina tales como imiquimod y resiquimod, análogos de oxoadenina y también análogos de nucleósidos tales como loxoribina y 7-tia-8-oxoguanosina, que se sabe que inducen interferón alfa. La publicación de solicitud de patente internacional número WO 2007/034882 (PCT/JP2006/318758; Dainippon Sumitomo Pharma Co. Ltd./AstraZeneca Aktiebolag) da a conocer ciertos compuestos de adenina identificados como útiles como medicamento.

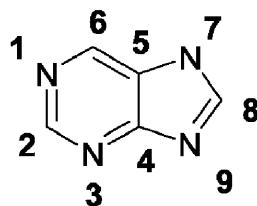
25 Se ha mostrado que ciertos compuestos derivados de adenina descritos en el documento WO 2010/018134 (PCT/EP2009/060267) son inductores de interferón humano y pueden presentar un perfil mejorado (con respecto a ciertos otros inductores conocidos de interferón humano), por ejemplo potencia mejorada, y pueden mostrar una selectividad mejorada por IFN α con respecto a factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Por ejemplo, ciertos compuestos indican una selectividad mayor de 1000 veces por la inducción de IFN α con respecto a la inducción de TNF α . Los compuestos que inducen interferón humano pueden ser útiles como adyuvantes de vacunas. Los compuestos que inducen interferón humano pueden ser útiles en el tratamiento de diversos trastornos, incluyendo enfermedades infecciosas, cáncer, afecciones inflamatorias y enfermedades alérgicas. Los compuestos que inducen interferón humano pueden ser útiles en el tratamiento de rinitis alérgica o asma.

30 Las referencias a 'alquilo' incluyen referencias a isómeros alifáticos tanto de cadena lineal como de cadena ramificada del correspondiente alquilo que contiene hasta ocho átomos de carbono, por ejemplo hasta seis átomos de carbono, o hasta cuatro átomos de carbono, o hasta dos átomos de carbono, o un átomo de carbono. Tales referencias a 'alquilo' son también aplicables cuando un grupo alquilo es parte de otro grupo, por ejemplo un grupo alquilamino o alcoxilo. Ejemplos de tales grupos alquilo y grupos que contienen grupos alquilo son alquilo C₁₋₈, alquilo C₁₋₆, alquilamino C₁₋₆ y alcoxilo C₁₋₆.

35 45 Las referencias a 'heterociclo' o 'heterociclico' se refieren a un anillo alifático heterocíclico saturado monocíclico que contiene cinco átomos de carbono y al menos un heteroátomo, heteroátomo que es nitrógeno, oxígeno o azufre. Tales anillos heterocíclicos incluyen piperidina o piperidinilo, donde el anillo contiene cinco átomos de carbono y un heteroátomo de nitrógeno.

50 Tal como se usa en el presente documento con respecto al compuesto 6-amino-9-[5-(4-piperidinil)pentil]-2-[(1S)-1-metilbutil]oxi]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, 'ligador de carbono' se refiere al resto -(CH₂)_n-, y puede denominarse alternativamente 'ligador de alquilo'. Por tanto, un ligador de "cinco carbonos" es -(CH₂)₅-.

55 A lo largo de toda esta memoria descriptiva, se usa el sistema de numeración de átomos de carbono generalmente aceptado del esqueleto de purina:



La siguiente lista proporciona definiciones de ciertas abreviaturas tal como se usan en el presente documento. La lista no es exhaustiva; el significado de las abreviaturas no definido a continuación resultará fácilmente evidente para los expertos habituales en la técnica.

5	DCM	diclorometano
10	DMF	N,N-dimetilformamida
	DMSO	dimetilsulfóxido
	ELISA	ensayo de inmunoadsorción enzimática
15	EtOAc	acetato de etilo
	H	horas
20	HCl	ácido clorhídrico
	Et ₃ N	trialilamina
	L	litros
25	CLEM	cromatografía de líquidos-espectrometría de masas
	Min	minutos
30	EM	espectrometría de masas
	NFkB	factor nuclear kappa B
	RMN	resonancia magnética nuclear
35	RMNes	resonancia magnética nuclear en estado sólido
	PBMC	células mononucleares de sangre periférica
40	PBS	solución salina tamponada con fosfato
	PRR	receptor de reconocimiento de patrones
	TA	temperatura ambiente
45	Depurado	eliminación de disolvente a presión reducida
	TFA	ácido trifluoroacético
50	TLR	receptor de tipo Toll
	TA	temperatura ambiente

Ha de entenderse que las referencias en el presente documento al compuesto de la invención quieren decir el compuesto 6-amino-9-[5-(4-piperidinil)pentil]-2-[(1S)-1-metilbutyl]oxi]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona como base libre, o como una sal farmacéuticamente aceptable.

La invención incluye dentro de su alcance todas las posibles formas estequiométricas y no estequiométricas de las

sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de la invención.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Para una revisión sobre sales adecuadas véase, por ejemplo, Berge *et al.*, J. Pharm. Sci., 66:1-19 (1977).

- 5 Los ejemplos de sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables del compuesto de la invención incluyen bromhidrato, clorhidrato, sulfato, *p*-toluenosulfonato, metanosulfonato, naftalenosulfonato y fenilsulfonato.
- 10 Los ejemplos de sales de bases farmacéuticamente aceptables incluyen sales de metales alcalinos tales como las de sodio y potasio, y sales de metales alcalinotérreos tales como las de calcio y magnesio.
- Pueden formarse sales usando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, por precipitación de la disolución seguido por filtración o por evaporación del disolvente.
- 15 Normalmente, puede formarse una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable por reacción del compuesto de la invención con un ácido fuerte adecuado (tales como ácidos bromhídrico, clorhídrico, sulfúrico, *p*-toluenosulfónico, metanosulfónico o naftalenosulfónico), opcionalmente en un disolvente adecuado tal como un disolvente orgánico, para dar la sal que habitualmente se aísla, por ejemplo, por cristalización y filtración.
- 20 Se apreciará que muchos compuestos orgánicos pueden formar complejos con disolventes en los que reaccionan o de los que precipitan o cristalizan. Estos complejos se conocen como "solvatos". Por ejemplo, un complejo con agua se conoce como "hidrato". Pueden usarse disolventes con puntos de ebullición altos y/o disolventes con una alta propensión a formar enlaces de hidrógeno tales como agua, etanol, alcohol *iso*-propílico y *N*-metilpirrolidinona para formar solvatos. Los métodos para la identificación de solvatos incluyen, pero no se limitan a, RMN y microanálisis. El 25 compuesto y las sales de la invención pueden existir en formas solvatadas y no solvatadas. Tal como se usa en el presente documento, el término solvato abarca solvatos tanto de un compuesto de base libre así como de cualquier sal del mismo.
- 30 El compuesto de la invención contiene un átomo quiral y, por tanto, puede existir en una o más formas estereoisoméricas. La presente invención abarca todos los estereoisómeros del compuesto de la invención, incluyendo isómeros ópticos, ya sea como estereoisómeros individuales o como mezclas de los mismos, incluyendo modificaciones racémicas. Cualquier estereoisómero puede contener menos del 10 % en peso, por ejemplo menos del 5 % en peso o menos del 0,5 % en peso, de cualquier otro estereoisómero. Por ejemplo, cualquier isómero óptico puede contener menos del 10 % en peso, por ejemplo menos del 5 % en peso o menos del 0,5 % en peso, de su 35 antípoda.
- El compuesto de la invención puede existir en formas tautoméricas. Se entenderá que la presente invención abarca todos los tautómeros del compuesto de la invención, ya sea como tautómeros individuales o como mezclas de los mismos, ya se indique o no explícitamente en las presentes fórmulas.
- 40 El compuesto de la invención puede estar en forma cristalina o amorfía. Además, algunas de las formas cristalinas del compuesto de la invención pueden existir como polimorfos, todas las cuales están incluidas dentro del alcance de la presente invención. La forma o formas polimórficas termodinámicamente más estables del compuesto de la invención son de particular interés.
- 45 Las formas polimórficas de los compuestos de la invención pueden caracterizarse y diferenciarse usando varias técnicas analíticas convencionales, incluyendo, pero sin limitarse a, difracción de polvo de rayos X (XRPD), espectroscopía infrarroja (IR), espectroscopía Raman, calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA) y resonancia magnética nuclear de estado sólido (RMNes).
- 50 Se apreciará de lo anterior que están incluidos dentro del alcance de la invención hidratos, isómeros y formas polimórficas del compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.
- 55 Los ejemplos de estados patológicos en los que el compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo tienen efectos potencialmente beneficiosos incluyen enfermedades alérgicas y otras afecciones inflamatorias (por ejemplo, rinitis alérgica y asma), enfermedades infecciosas y cáncer. El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo también son de uso potencial como adyuvantes de vacunas.
- 60 Como moduladores de la respuesta inmunitaria, el compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo también pueden ser útiles como agentes terapéuticos, o bien solos o bien en combinación con otros compuestos, en el tratamiento y/o la prevención de trastornos mediados por el sistema inmunitario, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedades inflamatorias o alérgicas tales como asma, rinitis alérgica y rinoconjuntivitis, alergia alimentaria, enfermedades pulmonares por hipersensibilidad, neumonitis eosinofílica, trastornos de hipersensibilidad de tipo retardado, aterosclerosis, pancreatitis, gastritis, colitis, osteoartritis, psoriasis, sarcoidosis, fibrosis pulmonar,

síndrome de dificultad respiratoria, bronquiolitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, sinusitis, fibrosis quística, queratosis actínica, displasia cutánea, urticaria crónica, eccemas y todo tipo de dermatitis.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, la prevención (o profilaxis) de la enfermedad se refiere a la administración o el uso de un compuesto o composición en un sujeto, antes de que el sujeto haya desarrollado una enfermedad particular, con el fin de reducir la posibilidad de que el sujeto desarrolle la enfermedad o para reducir la gravedad de la enfermedad en caso de que el sujeto la desarrolle. Por tanto, aunque la prevención o profilaxis pueden no prevenir el desarrollo de la enfermedad en cada sujeto tratado, la aparición o gravedad de la enfermedad en un grupo de sujetos tratados mejorará en comparación con un grupo de control de sujetos no tratados.
- 10 El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo también pueden ser útiles en el tratamiento y/o la prevención de reacciones frente a infecciones respiratorias, incluyendo, pero sin limitarse a, exacerbaciones virales de las vías respiratorias y amigdalitis. El compuesto de la invención también puede ser útil en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades autoinmunitarias incluyendo, pero sin limitarse a, artritis reumatoide, 15 artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Sjögren, espondilitis anquilosante, esclerodermia, dermatomiositis, diabetes, rechazo de injertos, incluyendo enfermedad de injerto contra huésped, enfermedades inflamatorias del intestino incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.
- 20 El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo también pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas incluyendo, pero sin limitarse a, las provocadas por virus de la hepatitis (por ejemplo, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C), virus de la inmunodeficiencia humana, virus del papiloma, virus del herpes, virus respiratorios (por ejemplo, virus influenza, virus respiratorio sincitial, rinovirus, metaneumovirus, parainfluenzavirus, SARS) y virus del Nilo Occidental. El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo también pueden ser útiles en el tratamiento de infecciones microbianas provocadas, por ejemplo, 25 por bacterias, hongos o protozoos. Estas incluyen, pero no se limitan a, tuberculosis, neumonía bacteriana, aspergilosis, histoplasmosis, candidiasis, neumocistosis, lepra, clamidiosis, enfermedad criptocócica, criptosporidiosis, toxoplasmosis, leishmania, malaria y tripanosomiasis.
- 30 El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo también pueden ser útiles en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, en particular el tratamiento de cánceres que se sabe que responden a la inmunoterapia e incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, melanoma, leucemia, linfomas y cáncer de ovario.
- 35 Un "sujeto", tal como se usa en el presente documento, comprende sujetos mamíferos e incluye sujetos mamíferos que no son primates, sujetos primates y sujetos humanos. Tal como se usa en el presente documento, terapia o tratamiento de una enfermedad se refiere a una acción capaz de mejorar los síntomas de la enfermedad y/o prolongar la expectativa de vida esperada o la supervivencia sin enfermedad de un sujeto que padece la enfermedad. Las referencias en el presente documento a tratamiento o terapia pueden, dependiendo de la afección, extenderse al tratamiento profiláctico para reducir el riesgo de que un sujeto contraiga o desarrolle una enfermedad.
- 40 40 Tal como se menciona en el presente documento, el compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo pueden ser útiles como agentes terapéuticos.
- 45 El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo pueden formularse para su administración de cualquier modo conveniente.
- 50 El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo pueden, por ejemplo, formularse para administración oral, tópica, inhalada, intranasal, bucal, parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular) o rectal. En un aspecto, el compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo se formulan para administración oral. En un aspecto adicional, el compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo se formulan para administración tópica, por ejemplo, administración intranasal o inhalada.
- 55 55 Los comprimidos y las cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales tales como aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábigo, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón, celulosa o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio o sorbitol; lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenenglicol o sílice; disgregantes, por ejemplo, almidón de patata, croscarmelosa sódica o glicolato sódico de almidón; o agentes humectantes tales como laurilsulfato de sodio. Los comprimidos pueden recubrirse según métodos bien conocidos en la técnica.
- 60 60 Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones, disoluciones, emulsiones, jarabes o elixires acuosos u oleosos, o pueden presentarse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo, jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina,

- hidroximetilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio o grasas comestibles hidrogenadas; agentes emulsionantes, por ejemplo, lecitina, monooleato de sorbitano o goma arábiga; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol o alcohol etílico; o conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico.
- 5 Las preparaciones también pueden contener sales de tampón, agentes aromatizantes, colorantes y/o edulcorantes (por ejemplo, manitol), según sea apropiado.
- Las composiciones para administración intranasal incluyen composiciones acuosas administradas a la nariz mediante gotas o mediante una bomba presurizada. Las composiciones adecuadas contienen agua como diluyente o portador para este fin. Las composiciones para administración al pulmón o la nariz pueden contener uno o más excipientes, por ejemplo, uno o más agentes de suspensión, uno o más conservantes, uno o más tensioactivos, uno o más agentes de ajuste de la tonicidad, uno o más codisolvientes y pueden incluir componentes para controlar el pH de la composición, por ejemplo, un sistema tampón. Además, las composiciones pueden contener otros excipientes tales como antioxidantes, por ejemplo, metabisulfito de sodio y agentes que enmascaran el sabor. Las composiciones 10 también pueden administrarse a la nariz u otras regiones del tracto respiratorio mediante nebulización.
- 15 Las composiciones intranasales pueden permitir que el compuesto de la invención o sal(es) farmacéuticamente aceptable(s) del mismo se administre(n) a todas las áreas de las cavidades nasales (el tejido diana) y, además, pueden permitir que el compuesto de la invención o sales farmacéuticamente aceptables del mismo permanezcan en contacto con el tejido diana durante períodos de tiempo más prolongados. Un régimen de dosificación adecuado para las 20 composiciones intranasales sería que el paciente inhalara lentamente por la nariz después de limpiar la cavidad nasal. Durante la inhalación, la composición se administraría a una fosa nasal mientras que la otra se comprime manualmente. Este procedimiento se repetiría luego para la otra fosa nasal. Normalmente, se administrarían una o dos pulverizaciones por fosa nasal mediante el procedimiento anterior una, dos o tres veces al día, idealmente una vez al día. De particular interés son composiciones intranasales adecuadas para la administración una vez al día.
- 25 El/los agente(s) de suspensión, si se incluyen, estará(n) normalmente presente(s) en una cantidad de desde el 0,1 hasta el 5 % (p/p), tal como del 1,5 % al 2,4 % (p/p), basándose en el peso total de la composición. Los ejemplos de agentes de suspensión farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, AVICEL® (celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa sódica), carboximetilcelulosa sódica, veegum, tragacanto, bentonita, metilcelulosa, goma xantana, carbopol y polietilenglicoles.
- 30 Las composiciones para administración al pulmón o la nariz pueden contener uno o más excipientes y pueden protegerse de la contaminación y el crecimiento microbiano o fúngico mediante la inclusión de uno o más conservantes. Los ejemplos de conservantes o agentes antimicrobianos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, compuestos de amonio cuaternario (por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cetrimida, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de lauralconio y cloruro de miristilpicolinio), agentes mercuriales (por ejemplo, nitrato fenilmercuríco, acetato de fenilmercurio y timerosal), agentes alcohólicos (por ejemplo, clorobutanol, alcohol feniletílico y alcohol bencílico), ésteres antibacterianos (por ejemplo, ésteres de ácido para-hidroxibenzoico), agentes quelantes 35 tales como edetato de disodio (EDTA) y otros agentes antimicrobianos tales como clorhexidina, clorocresol, ácido sórbico y sus sales (tales como sorbato de potasio) y polimixina. Los ejemplos de conservantes o agentes antifúngicos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, benzoato de sodio, ácido sórbico, propionato de sodio, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno. El/los conservante(s), si se incluye(n), puede(n) estar 40 presente(s) en una cantidad de desde el 0,001 hasta el 1 % (p/p), tal como desde el 0,015 % hasta el 0,5 % (p/p) basándose en el peso total de la composición.
- 45 Las composiciones (por ejemplo, en las que al menos un compuesto está en suspensión) pueden incluir uno o más tensioactivos que funcionan facilitando la disolución de las partículas de medicamento en la fase acuosa de la composición. Por ejemplo, la cantidad de tensioactivo usada es una cantidad que no provocará la formación de espuma durante el mezclado. Los ejemplos de tensioactivos farmacéuticamente aceptables incluyen alcoholes grasos, ésteres y éteres, tales como monooleato de polioxietilen (20) sorbitano (polisorbato 80), éteres de macrogol y poloxámeros. El tensioactivo puede estar presente en una cantidad de entre aproximadamente el 0,01 y el 10 % (p/p), tal como desde el 0,01 hasta el 0,75 % (p/p), por ejemplo, aproximadamente el 0,5 % (p/p), basándose en el peso total de la composición.
- 50 55 Pueden incluirse uno o más agentes de ajuste de la tonicidad para lograr la tonicidad con los fluidos corporales, por ejemplo fluidos de la cavidad nasal, lo que da como resultado niveles reducidos de irritación. Los ejemplos de agentes de ajuste de la tonicidad farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, cloruro de sodio, dextrosa, xilitol, cloruro de calcio, glucosa, glicerina y sorbitol. Un agente de ajuste de la tonicidad, si está presente, puede incluirse en una cantidad de desde el 0,1 hasta el 10 % (p/p), tal como desde el 4,5 hasta el 5,5 % (p/p), por ejemplo, aproximadamente el 5,0 % (p/p), basándose en el peso total de la composición.
- Las composiciones de la invención pueden tamponarse mediante la adición de agentes tamponantes adecuados tales como citrato de sodio, ácido cítrico, trometamol, fosfatos tales como fosfato de disodio (por ejemplo, las formas

dodecahidratada, heptahidratada, dihidratada y anhidra), o fosfato de sodio y mezclas de los mismos.

Un agente tamponante, si está presente, puede incluirse en una cantidad de desde el 0,1 hasta el 5 % (p/p), por ejemplo, del 1 al 3 % (p/p) basándose en el peso total de la composición.

- 5 Los ejemplos de agentes que enmascaran el sabor incluyen sucralosa, sacarosa, sacarina o una sal de la misma, fructosa, dextrosa, glicerol, jarabe de maíz, aspartamo, acesulfamo-K, xilitol, sorbitol, eritritol, glicirrincinato de amonio, taumatina, neotamo, manitol, mentol, aceite de eucalipto, alcanfor, un agente aromatizante natural, un agente aromatizante artificial y combinaciones de los mismos.
 - 10 Pueden incluirse uno o más codisolvientes para ayudar a la solubilidad del/de los compuesto(s) de medicamento y/u otros excipientes. Los ejemplos de codisolvientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, propilenglicol, dipropilenglicol, etilenglicol, glicerol, etanol, polietilenglicoles (por ejemplo, PEG300 o PEG400) y metanol. En una realización, el codisolvente es propilenglicol.
 - 15 El/los codisolvente(s), si está(n) presente(s), puede(n) incluirse en una cantidad de desde el 0,05 hasta el 30 % (p/p), tal como desde el 1 hasta el 25 % (p/p), por ejemplo, desde el 1 hasta el 10 % (p/p) basándose en el peso total de la composición.
 - 20 Las composiciones para la administración inhalada incluyen mezclas acuosas, orgánicas o acuosas/orgánicas, polvo seco o composiciones cristalinas administradas al tracto respiratorio mediante una bomba presurizada o un inhalador, por ejemplo, inhaladores de polvo seco con depósito, inhaladores de polvo seco de dosis unitaria, inhaladores de polvo seco de múltiples dosis premedidas, inhaladores nasales o inhaladores de aerosol presurizados, nebulizadores o insufladores. Las composiciones adecuadas contienen agua como diluyente o portador para este fin y pueden proporcionarse con excipientes convencionales tales como agentes tamponantes, agentes modificadores de la tonicidad y similares. Las composiciones acuosas también pueden administrarse a la nariz y otras regiones del tracto respiratorio por nebulización. Tales composiciones pueden ser disoluciones o suspensiones acuosas o aerosoles administrados a partir de paquetes presurizados, tales como un inhalador de dosis medida, con el uso de un propelente licuado adecuado.
 - 25
 - 30
 - 35
 - 40
 - 45
 - 50
 - 55
 - 60
- Las composiciones para administración tópica a la nariz (por ejemplo, para el tratamiento de la rinitis) o al pulmón incluyen composiciones de aerosol presurizadas y composiciones acuosas administradas a las cavidades nasales mediante bomba presurizada. Las composiciones que no están presurizadas y son adecuadas para la administración tópica a la cavidad nasal son de particular interés. Las composiciones adecuadas contienen agua como diluyente o portador para este fin. Las composiciones acuosas para administración al pulmón o la nariz pueden proporcionarse con excipientes convencionales tales como agentes tamponantes, agentes modificadores de la tonicidad y similares. Las composiciones acuosas también pueden administrarse en la nariz mediante nebulización.
- Normalmente, puede usarse un dispensador de fluidos para administrar una composición de fluido a las cavidades nasales. La composición de fluido puede ser acuosa o no acuosa, pero normalmente acuosa. Un dispensador de fluidos de este tipo puede tener una boquilla dispensadora u orificio dispensador a través del cual se dispensa una dosis medida de la composición de fluido tras la aplicación de una fuerza aplicada por el usuario a un mecanismo de bomba del dispensador de fluidos. Tales dispensadores de fluidos generalmente están provistos de un depósito de múltiples dosis medidas de la composición de fluido, pudiendo dispensarse las dosis con accionamientos secuenciales de la bomba. La boquilla u orificio dispensador puede configurarse para su inserción en las fosas nasales del usuario para dispensar por pulverización la composición de fluido en la cavidad nasal. Un dispensador de fluidos del tipo mencionado anteriormente se describe y se ilustra en la publicación de solicitud de patente internacional número WO 2005/044354 (Glaxo Group Limited). En una realización, el dispensador de fluidos es del tipo general ilustrado en las figuras 30-40 del documento WO 2005/044354.
- Pueden administrarse también composiciones acuosas que contienen el compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo mediante una bomba tal como se da a conocer en la publicación de la solicitud de patente internacional número WO2007/138084 (Glaxo Group Limited), por ejemplo, tal como se da a conocer con referencia a las figuras 22-46 del mismo, o tal como se da a conocer en el documento WO2011/098451 (Glaxo Group Limited, GB0723418.0), por ejemplo tal como se da a conocer con referencia a las figuras 7-32 del mismo. La bomba puede accionarse mediante un accionador tal como se da a conocer en las figuras 1-6 del documento WO2011/098451.
- Las composiciones de polvo seco para administración tópica al pulmón por inhalación pueden, por ejemplo, presentarse en cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, o blísteres, por ejemplo, de papel de aluminio laminado, para su uso en un inhalador o insuflador. Las composiciones de combinación de polvo contienen generalmente una mezcla de polvo para la inhalación del compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una base de polvo adecuada (sustancia portadora/diluyente/excipiente) tal como mono-, di- o polisacáridos (por ejemplo, lactosa o almidón). Las composiciones de polvo seco también pueden incluir, además del fármaco y el

portador, un excipiente adicional (por ejemplo, un agente ternario tal como un éster de azúcar, por ejemplo, octaacetato de celobiosa, estearato de calcio o estearato de magnesio).

En una realización, puede incorporarse una composición adecuada para la administración inhalada en una pluralidad de recipientes de dosis sellados proporcionados en envase(s) de medicamentos montado(s) dentro de un dispositivo de inhalación adecuado. Los recipientes pueden ser rompibles, pelables o abriles de otro modo de uno en uno y las dosis de la composición de polvo seco pueden administrarse por inhalación en una boquilla del dispositivo de inhalación, tal como se conoce en la técnica. El envase de medicamento puede adoptar varias formas diferentes, por ejemplo, una forma de disco o una tira alargada. Los dispositivos de inhalación representativos son los dispositivos DISKHALER™ y DISKUS™, comercializados por GlaxoSmithKline.

Una composición inhalable de polvo seco también puede proporcionarse como un depósito a granel en un dispositivo de inhalación, estando dotado entonces el dispositivo de un mecanismo dosificador para dosificar una dosis de la composición desde el depósito hasta un canal de inhalación donde un paciente puede inhalar la dosis medida inhalando por una boquilla del dispositivo. Dispositivos comercializados a modo de ejemplo de este tipo son TURBUHALER™ (AstraZeneca), TWISTHALER™ (Schering) y CLICKHALER™ (Innovata.)

Un método de administración adicional para una composición inhalable de polvo seco es para dosis medidas de la composición que van a proporcionarse en cápsulas (una dosis por cápsula) que luego se cargan en un dispositivo de inhalación, normalmente por el paciente a demanda. El dispositivo tiene medios para romper, perforar o abrir de otro modo la cápsula de modo que la dosis pueda arrastrarse al interior del pulmón del paciente cuando inhala por la boquilla del dispositivo. Como ejemplos comercializados de tales dispositivos, pueden mencionarse ROTAHALER™ (GlaxoSmithKline) y HANDIHALER™ (Boehringer Ingelheim.)

Las composiciones de aerosol presurizadas adecuadas para inhalación pueden ser o bien una suspensión o bien una disolución y pueden contener el compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un propelente adecuado tal como un fluorocarbono o clorofluorocarbono que contiene hidrógeno o mezclas de los mismos, particularmente hidrofluoroalcanos, especialmente 1,1,1,2-tetrafluoroetano, 1,1,1,2,3,3-heptafluoro-n-propano o una mezcla de los mismos. La composición de aerosol puede contener opcionalmente excipientes de composición adicionales bien conocidos en la técnica, tales como tensioactivos, por ejemplo, ácido oleico, lecitina o un ácido oligoláctico o un derivado del mismo, por ejemplo, tal como se describe en los documentos WO 94/21229 y WO 98/34596 (Minnesota Mining and Manufacturing Company) y codisolventes, por ejemplo, etanol. Las composiciones presurizadas generalmente se retendrán en un bote (por ejemplo, un bote de aluminio) cerrado con una válvula (por ejemplo, una válvula dosificadora) y montado en un accionador provisto de una boquilla.

Pueden formularse pomadas, cremas y geles, por ejemplo, con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes y/o disolventes adecuados. Tales bases, por tanto, pueden incluir, por ejemplo, agua y/o un aceite tal como parafina líquida o un aceite vegetal tal como aceite de cacahuete o aceite de ricino, o un disolvente tal como polietilenglicol. Los agentes espesantes y gelificantes que pueden usarse según la naturaleza de la base incluyen parafina blanda, estearato de aluminio, alcohol cetoestearílico, polietilenglicoles, grasa de lana, cera de abeja, carboxipolimetileno y derivados de celulosa, y/o monoestearato de glicerilo y/o agentes emulsionantes no iónicos.

Pueden formularse lociones con una base acuosa u oleosa y, en general, también contendrán uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión o agentes espesantes.

Pueden formarse polvos para aplicación externa con la ayuda de cualquier base de polvo adecuada, por ejemplo, talco, lactosa o almidón. Pueden formularse gotas con una base acuosa o no acuosa que también comprende uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes, agentes de suspensión o conservantes.

El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, por ejemplo, pueden formularse para administración transdérmica mediante una composición en parches u otros dispositivos (por ejemplo, dispositivos de gas presurizados) que administran el componente activo a la piel.

Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo también pueden formularse como supositorios, por ejemplo, que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo también pueden formularse para administración parenteral mediante inyección en bolo o infusión continua y pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como ampollas, viales, infusiones de pequeño volumen o jeringas precargadas, o en recipientes de múltiples dosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como disoluciones,

- 5 suspensiones o emulsiones en vehículos acuosos o no acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como antioxidantes, tampones, agentes antimicrobianos y/o agentes de ajuste de la tonicidad. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, libre de pirógenos, antes de su uso. La presentación sólida seca puede prepararse llenando asépticamente un polvo estéril en recipientes estériles individuales o llenando asépticamente una disolución estéril en cada recipiente y secando por pulverización.
- 10 El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo también pueden formularse con vacunas como adyuvantes. Tales composiciones pueden contener anticuerpo(s) o fragmento(s) de anticuerpo o un componente antigénico que incluye, pero no se limita a, proteína, ADN, bacterias vivas o muertas y/o virus o partículas similares a virus, junto con uno o más componentes con actividad adyuvante incluyendo, pero sin limitarse a, sales de aluminio, emulsiones de aceite y agua, proteínas de choque térmico, preparaciones y derivados de lípido A, glicolípidos, otros agonistas de TLR tales como ADN CpG o agentes similares, citocinas tales como factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o interleucina-12 (IL-12) o agentes similares.
- 15 15 El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo pueden emplearse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo y el/los otro(s) agente(s) farmacéuticamente activo(s) pueden administrarse juntos o por separado y, cuando se administran por separado, la administración puede producirse simultánea o secuencialmente, en cualquier orden.
- 20 20 Las cantidades del compuesto de la invención o sal(es) farmacéuticamente aceptable(s) del mismo y el/los otro(s) agente(s) farmacéuticamente activo(s) y los tiempos relativos de administración se seleccionarán con el fin de lograr el efecto terapéutico combinado deseado. La administración de una combinación del compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con otros agentes de tratamiento puede ser en combinación mediante administración concomitante en una composición farmacéutica unitaria que incluye ambos compuestos, o en 25 composiciones farmacéuticas separadas que incluyen cada una uno de los compuestos. Alternativamente, la combinación puede administrarse por separado de manera secuencial en la que un agente de tratamiento se administra en primer lugar y el otro en segundo lugar o viceversa. Tal administración secuencial puede ser cercana en el tiempo o remota en el tiempo.
- 30 30 El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo pueden usarse en combinación con uno o más agentes útiles en la prevención o el tratamiento de infecciones virales. Los ejemplos de tales agentes incluyen, sin limitación; inhibidores de la polimerasa tales como los dados a conocer en el documento WO 2004/037818-A1, así como los datos a conocer en los documentos WO 2004/037818 y WO 2006/045613; JTK-003, JTK-019, NM-283, HCV-796, R-803, R1728, R1626, así como los datos a conocer en los documentos WO 35 2006/018725, WO 2004/074270, WO 2003/095441, US2005/0176701, WO 2006/020082, WO 2005/080388, WO 2004/064925, WO 2004/065367, WO 2003/007945, WO 02/04425, WO 2005/014543, WO 2003/000254, EP 1065213, WO 01/47883, WO 2002/057287, WO 2002/057245 y agentes similares; inhibidores de la replicación tales como los inhibidores de la proteasa del VIH saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, fosamprenavir, brecanavir, atazanavir, tipranavir, palinavir, lasinavir y los inhibidores de la proteasa del VHC BILN2061, VX-950, SCH503034; y agentes similares; inhibidores de transcriptasa inversa nucleosídicos y nucleotídicos tales como zidovudina, didanosina, lamivudina, zalcitabina, abacavir, estavudina, adefovir, adefovir dipivoxil, fozividina, todoxil, emtricitabina, alovudina, amdoxovir, elvucitabina y agentes similares; inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos (incluyendo un agente que tiene actividad antioxidante tal como immunocal, oltipraz, etc.) tales como nevirapina, 40 delavirdina, efavirenz, lovirida, immunocal, oltipraz, capravirina, TMC-278, TMC-125, etravirina y agentes similares; inhibidores de entrada tales como enfuvirtida (T-20), T-1249, PRO-542, PRO-140, TNX-355, BMS-806, 5-Helix y agentes similares; inhibidores de la integrasa tales como L-870,180 y agentes similares; inhibidores de la gemación tales como PA-344 y PA-457 y agentes similares; inhibidores de los receptores de quimiocinas tales como vicriviroc (Sch-C), Sch-D, TAK779, maraviroc (UK-427.857), TAK449, así como los datos a conocer en los documentos WO 45 50 02/74769, WO 2004/054974, WO 2004/055012, WO 2004/055010, WO 2004/055016, WO 2004/055011 y WO 2004/054581, y agentes similares; inhibidores de neuraminidasa tales como CS-8958, zanamivir, oseltamivir, peramivir y agentes similares; bloqueantes de canales iónicos tales como amantadina o rimantadina y agentes similares; y ARN de interferencia y oligonucleótidos antisentido tales como ISIS-14803 y agentes similares; agentes antivirales de mecanismo de acción indeterminado, por ejemplo, los datos a conocer en los documentos WO 2005/105761, WO 2003/085375, WO 2006/122011, ribavirina y agentes similares. El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo también pueden usarse en combinación con uno o más de otros agentes que pueden ser útiles en la prevención o el tratamiento de infecciones virales, por ejemplo, inmunoterapias (por ejemplo, interferón u otras citocinas/quimiocinas, moduladores de receptores de citocinas/quimiocinas, agonistas o antagonistas de citocinas y agentes similares); y vacunas terapéuticas, agentes antifibróticos, agentes antiinflamatorios tales como corticosteroides o agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y agentes similares.
- 55 60 El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo pueden usarse en combinación con uno o más otros agentes que pueden ser útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo: inmunoterapia antigénica, antihistamínicos,

- esteroides, antiinflamatorios no esteroideos (AINE), broncodilatadores (por ejemplo, agonistas beta 2, agonistas adrenérgicos, agentes anticolinérgicos, teofilina), metotrexato, moduladores de leucotrienos y agentes similares; terapia con anticuerpos monoclonales tales como anti-inmunoglobulina E (IgE), anti-TNF, anti-IL-5, anti-IL-6, anti-IL-12, anti-IL-1 y agentes similares; terapias de receptores, por ejemplo, entanercept y agentes similares; inmunoterapias 5 no específicas de抗原 (por ejemplo, interferón u otras citocinas/quimiocinas, moduladores de receptores de citocinas/quimiocinas, agonistas o antagonistas de citocinas, agonistas de TLR y agentes similares).
- El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo pueden usarse en combinación con uno o más otros agentes que pueden ser útiles en la prevención o el tratamiento del cáncer, por ejemplo, agentes 10 quimioterápicos tales como agentes alquilantes, inhibidores de topoisomerasa, antimetabolitos, agentes antimitóticos, inhibidores de cinasas y agentes similares; terapia con anticuerpos monoclonales tales como trastuzumab, gemtuzumab y otros agentes similares; y terapia hormonal tal como tamoxifeno, goserelina y agentes similares.
- Las composiciones farmacéuticas según la invención también pueden usarse solas o en combinación con al menos 15 otro agente terapéutico en otras áreas terapéuticas, por ejemplo, enfermedades gastrointestinales. Las composiciones según la invención también pueden usarse en combinación con la terapia de reemplazo génico.
- La invención incluye en un aspecto adicional una combinación que comprende un compuesto de la invención, o una 20 sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con al menos otro agente terapéuticamente activo.
- Las combinaciones a las que se hizo referencia anteriormente pueden presentarse convenientemente para su uso en forma de una composición farmacéutica y, por tanto, las composiciones farmacéuticas que comprenden una combinación tal como se definió anteriormente junto con al menos un diluyente o portador farmacéuticamente 25 aceptable del mismo representan un aspecto adicional de la invención.
- Una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo dependerá de varios factores. Por ejemplo, la especie, la edad y el peso del sujeto receptor, la afección precisa 30 que requiere tratamiento y su gravedad, la naturaleza de la composición y la vía de administración son todos factores a considerar. La cantidad terapéuticamente eficaz, en última instancia, debe quedar a discreción del médico encargado. Independientemente, una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención para el tratamiento 35 de seres humanos generalmente debe estar en el intervalo de 0,0001 a 100 mg/kg de peso corporal del receptor al día. Más habitualmente, la cantidad eficaz debe estar en el intervalo de 0,001 a 10 mg/kg de peso corporal al día. Por lo tanto, para un adulto de 70 kg, un ejemplo de una cantidad real al día sería normalmente de desde 7 hasta 700 mg. Para las vías de administración intranasal e inhalada, las dosis típicas para un adulto de 70 kg deben estar en el 40 intervalo de 1 microgramo a 1 mg al día. Esta cantidad puede administrarse en una sola dosis al día o en varias (como dos, tres, cuatro, cinco o más) subdosis al día de manera que la dosis diaria total sea la misma. Una cantidad eficaz de una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de la invención puede determinarse como una proporción de la cantidad eficaz del compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo *per se*. Dosificaciones similares deben ser apropiadas para el tratamiento de las otras afecciones a las que se hace referencia en el presente documento.
- El compuesto de la invención y sales farmacéuticamente aceptables del mismo también pueden administrarse a cualquier frecuencia apropiada, por ejemplo, 1-7 veces a la semana. Por supuesto, el régimen de dosificación preciso 45 dependerá de factores tales como la indicación terapéutica, la edad y el estado del sujeto, y la vía de administración particular elegida.
- Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse en formas de dosis unitaria que contienen una cantidad predeterminada de principio activo por dosis unitaria. Tal unidad puede contener, por ejemplo, de 0,5 mg a 1 g del compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, dependiendo de la afección que está 50 tratándose, la vía de administración y la edad, el peso y el estado del paciente. Composiciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis o subdosis diaria, tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de la misma, de un principio activo. Tales composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica.
- Por tanto, se proporciona además una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención, o una 55 sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.
- También se proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica de este tipo que comprende mezclar el compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, con uno o más diluyentes o 60 portadores farmacéuticamente aceptables.
- A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra 'comprenden', y variaciones tales como 'comprende' y 'que comprende', se entenderá que implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros establecido, pero no la exclusión de cualquier otro número

entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

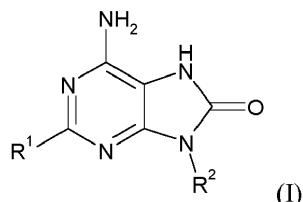
Se describen métodos de preparación de compuestos de oxoadenina y sales de los mismos en el documento WO 2010/018134. En el presente documento se describen métodos para preparar 6-amino-9-[5-(4-piperidinil)pentil]-2-[(1S)-1-metilbutil]oxi]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Ejemplos

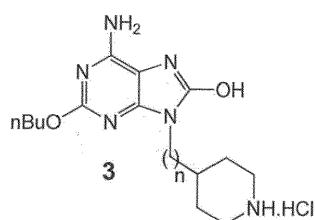
Ejemplo de referencia 1: Síntesis de oxoadeninas sustituidas en la posición 9

En el caso de la activación de TLR7 y TLR8, se han identificado unas cuantas clases diferentes de miméticos de molécula pequeña de los ligandos naturales de ARNm viral rico en uridina y/o guanosina, incluyendo 1H-imidazo[4,5-c]quinolonas y 8-hidroxiadeninas. Véase Heil, *et al.*, Eur. J. Immunol. 2003, 33, 2987-2997; Hemmi, *et al.*, Nat Immunol 2002, 3, 196-200; Lee, *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2006, 103, 1828-1833; Gerster, *et al.*, J. Med. Chem. 2005, 48, 3481-3491; Hirota, *et al.*, J. Med. Chem. 2002, 45, 5419-5422. Se han realizado diversas evaluaciones de las relaciones de estructura-actividad en oxoadeninas. Véase Isobe, *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry 2003, 11, 3641-3647; Kurimoto, *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry 2003, 11, 5501-5508; Kurimoto, *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry 2004, 12, 1091-1099; Isobe, *et al.*, J. Med. Chem. 2006, 49, 2088-2095; Jin, *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2006, 16, 4559-4563; Pryde, *et al.*, R. Med. Chem. Commun. 2011, 2, 185-189; Kurimoto, *et al.*, J. Med. Chem. 2010, 53, 2964-2972. Nakamura, *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2013, 23, 669-672; Weterings, *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2009, 19, 2249-2251.

Los presentes inventores emprendieron un estudio de la relación de estructura-actividad sobre oxoadeninas sustituidas con grupos no aromáticos en la posición 9. Estudios previos han examinado unos cuantos derivados de 9-alquilo y sugirieron que la introducción de un alquilo (i-propilo, butilo, c-pentilo, c-hexilo) en la posición 9 daba como resultado una actividad débil y disminuida (Hirota, *et al.*, J. Med. Chem. 2002, 45, 5419-5422; Isobe, *et al.*, J. Med. Chem. 2006, 49, 2088-2095). Los presentes estudios se centraron en la síntesis y evaluación biológica de una serie de siete oxoadeninas de fórmula I:



donde R¹ es n-butoxilo, y donde R² es un resto piperidinilalquilo en el que la longitud del ligador de carbono oscilaba entre 0 y 6 carbonos:

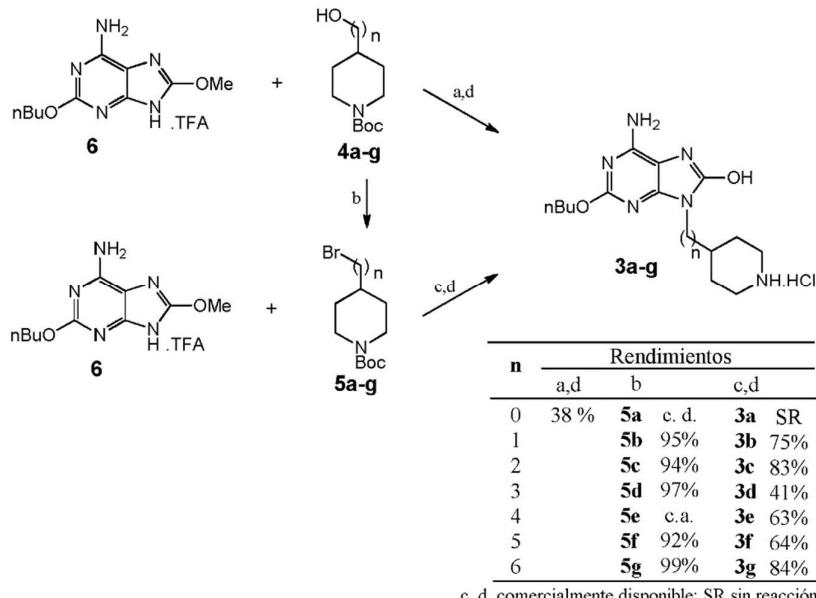


Estos compuestos (3a-g) se evaluaron *in vitro* para determinar la selectividad de TLR7/8 y la inducción de citocinas. El compuesto 3a no tiene ligador de carbono (n=0); 3b un ligador de un carbono (n=1); 3c un ligador de dos carbonos (n=2); 3d un ligador de tres carbonos (n=3); 3e un ligador de cuatro carbonos (n=4); 3f un ligador de cinco carbonos (n=5) y 3g un ligador de seis carbonos (n=6).

Las 9-piperidinilalquinoxadeninas 3a-g se sintetizaron tal como se explica resumidamente en el esquema 1 por medio del producto intermedio avanzado común (CAI) 6. (Tanji *et al.*, Science 2013, 339, 1426-1429.) Se preparó fácilmente el CAI 6 en una multiescala de 10 g en 6 etapas y con un rendimiento global >50 % partiendo de la dicloropurina 7 comercialmente disponible (esquema 2). En el esquema 2, la dicloropurina 7 se protegió como el derivado de 9-tetrahidropiranilo y se sustituyó en la posición 6 mediante tratamiento con NH₃ 2 M en isopropanol a 60 °C para dar la 2-cloroadenina 8 con un rendimiento del 86 %. La reacción de 8 con *terc*-butóxido de sodio en *n*-butanol a 100 °C condujo a la adenina funcionalizada 9 con un rendimiento del 85 %. La adenina 9 protegida con THP se convirtió en el CAI 6 en 3 etapas y con un rendimiento global del 87 % mediante 8-bromación, desplazamiento de bromuro con

- metóxido y desprotección de THP con ácido trifluoroacético (TFA). La alquilación de CAI 6 con los diversos bromuros de N-piperidinilo 5b-g protegidos con *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) en presencia de carbonato de potasio en dimetilformamida (DMF) seguido por desprotección ácida de los grupos Boc y metilo con HCl 4 N en dioxano condujo a las oxoadeninas deseadas 3b-g con rendimientos del 41-84 % (esquema 1). La alquilación de CAI 6 con bromuro de 5a falló y se preparó en su lugar la oxoadenina 3a con un rendimiento del 38 % mediante reacción de Mitsunobu de CAI 6 con alcohol 4a en presencia de DIAD y PPh₃ a 70 °C seguido por desprotección ácida (esquema 1).

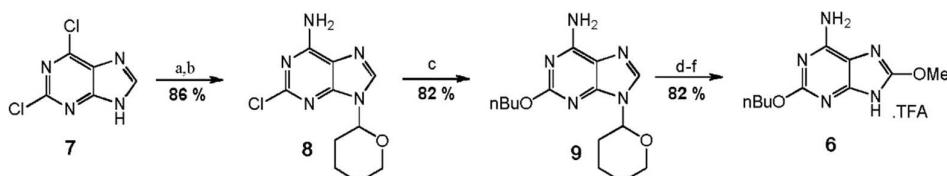
Esquema 1



- 10 *Reactivos:* (a) TEA, PPh₃, DIAD, DMF, 70 °C, 15 h; (b) CBr₄, PPh₃, CH₂Cl₂ TA, 1 h; (c) K₂CO₃, DMF, 50 °C, 20 h; (d) HCl 4 N/dioxano, MeOH, TA, 1 h;

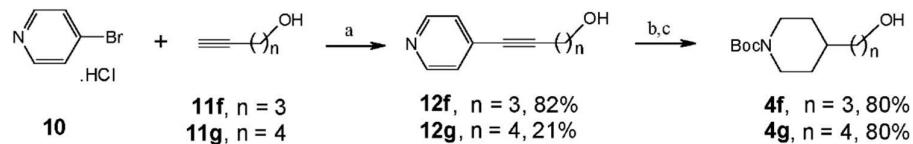
El compuesto 3a no tenía ligador de carbono (n=0); 3b un ligador de un carbono (n=1); 3c un ligador de dos carbonos (n=2); 3d un ligador de tres carbonos (n=3); 3e un ligador de cuatro carbonos (n=4); 3f un ligador de cinco carbonos (n=5) y 3g un ligador de seis carbonos (n=6).

Esquema 2: Síntesis del compuesto intermedio avanzado común 6



- 20 *Reactivos:* (a) 3,4-dihidropirano, pTsOH, AcOEt, 50 °C, 2 h; (b) NH₃ 2 M en iPrOH, 60 °C, 7 h; (c) tBuONa, nBuOH, 100 °C, 15 h; (d) NBS, CH₂Cl₂, ta, 5 h; (e) NaOMe, MeOH, refluxo, 4 h; (f) TFA, MeOH, ta, 15 h

Cuando no estaban comercialmente disponibles, se prepararon los bromuros (5b-d, f-g) con un rendimiento >90 % mediante bromación de los correspondientes alcoholes usando condiciones de Appel (Ph₃P/CBr₄). Los alcoholes 4f-g no estaban comercialmente disponibles y se prepararon en 3 etapas a partir de bromopiridina 8 mediante (i) acoplamiento cruzado de 10 con los alcoholes acetilénicos 11f o 11g, (ii) reducción de 12f y 12g con hidrógeno en presencia de catalizador de Rh al 5 %/C y (iii) protección con Boc del grupo amina (esquema 3):

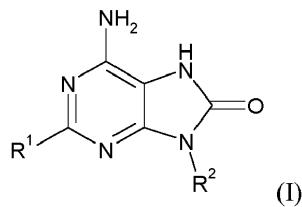
Esquema 3: Síntesis de los alcoholes **4f** y **4g**

Reactivos: (a) $(\text{PPh}_3)\text{PdCl}_2$, CuI, TEA, Δ 30 min; (b) H-Cube, Rh al 5 %/C, H_2 , AcOH, 90 °C; (c) BOC_2O , TEA, CH_2Cl_2 , ta, 30 min.

5

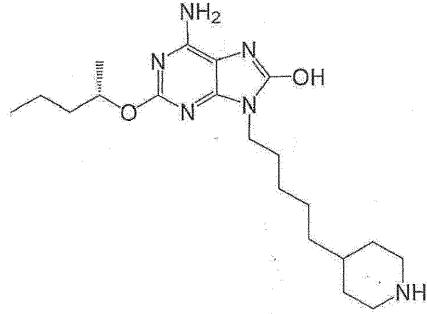
Ejemplo 2: Síntesis del compuesto de oxoadenina 3x

Se preparó una oxoadenina adicional (compuesto 3x) de fórmula I, donde:



10

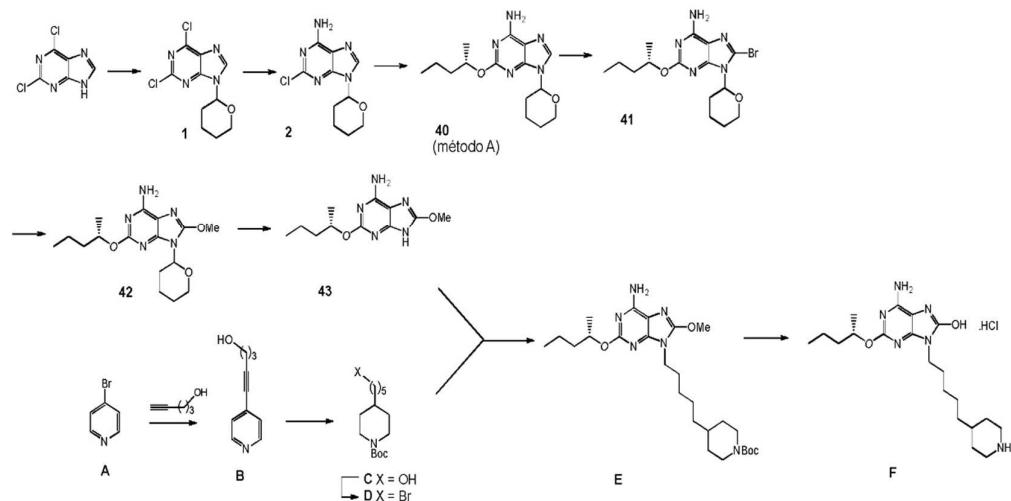
donde R^1 es (1S)-1-metilbutoxilo, y donde R^2 es un resto piperidinilalquilo en el que la longitud del ligador de carbono es de 5 carbonos. Compuesto 3x:



15

Se dan a conocer también oxoadeninas y métodos para preparar oxoadeninas en el documento WO2010/018134.

La síntesis de la oxoadenina 3x se llevó a cabo según el esquema 4 (véase también la figura 9) y tal como se describe a continuación. Los compuestos intermedios 1, 2, 40, 41, 42 y 43 se describen adicionalmente en el documento WO2010/018134 (la misma numeración de estos compuestos intermedios se usa en el presente documento, tal como se usa en el documento WO2010/018134).

Esquema 4

- Tal como se muestra en el esquema 4, se repartió clorhidrato de 4-bromopiridina A (2,5 g) entre hidróxido de sodio 1 N (20 ml) y acetato de etilo (3 x 20 ml). Se separó la fase orgánica, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a vacío.
- 5 Se disolvió el aceite resultante en TEA (2,6 M) y se desgasificó bajo nitrógeno. Se añadió 4-pentin-1-ol (1,1 eq.) seguido por cloruro de bis(trifenilfosfina)palladio (II), (0,01 eq.) y yoduro de cobre (I) (0,02 eq.) y se agitó la mezcla de reacción a refluo durante 20 min. El tratamiento final acuoso (acetato de etilo/agua) y la purificación mediante cromatografía sobre gel de sílice (gradiente del 0-30 % de acetato de etilo en heptano) condujeron a B con un rendimiento del 82 %. Se disolvió B en ácido acético (0,05 M) y se hidrogenó la disolución usando un reactor de hidrogenación de flujo continuo H-CUBE® (ThalesNano) (cartucho de $Pd(OH)_2$ al 20 %/C, 100 bares de H_2 , 90 °C, 1 ml/min).

Una vez completada la hidrogenación, se concentró la mezcla de reacción y se secó a vacío. Se disolvió el producto en bruto resultante en CH_2Cl_2 (0,4 M), y se hizo reaccionar con Et_3N (1,5 eq.) y dicarbonato de di-*t*-butilo (1,2 eq.) a temperatura ambiente durante 30 min. Después del tratamiento final acuoso (CH_2Cl_2/H_2O) y la purificación mediante cromatografía sobre gel de sílice (gradiente del 0-30 % de acetato de etilo en heptano), se aisló C con un rendimiento del 80 %: 1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4,06 (s, 2H), 3,64 (t, 2H), 2,66 (t, 2H), 1,54-1,66 (m, 5H), 1,45 (s, 9H), 1,24-1,39 (m, 8H), 1,08 (m, 2H).

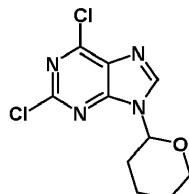
20 Se añadieron lentamente CBr_4 (1,6 eq.) y PPh_3 (1,2 eq.) (reacción exotérmica) a una disolución de C en CH_2Cl_2 (0,45 M) a 0 °C. Después de 5 minutos, se permitió que la mezcla de reacción se calentara hasta temperatura ambiente, se agitó a temperatura ambiente durante 45 min, se concentró y se purificó directamente mediante cromatografía sobre gel de sílice (gradiente del 0-30 % de acetato de etilo en heptano) para dar D con un rendimiento del 92 %.

25 Se añadió K_2CO_3 (325 de malla, 3,0 eq.) a una disolución de 43 en DMF (0,25 M) y se sonó la mezcla de reacción varios segundos para obtener una suspensión fina, luego se agitó a 60 °C durante 1 h. Después de enfriar hasta 50 °C, se añadió D (1,2 eq.) y se agitó la mezcla de reacción durante la noche a 50 °C. Después de enfriar hasta temperatura ambiente y el tratamiento final acuoso (acetato de etilo/agua), se purificó el producto en bruto resultante mediante cromatografía sobre gel de sílice (gradiente del 0-10 % de metanol en cloroformo).

El producto purificado E se disolvió en metanol (0,1 M) y se hizo reaccionar con HCl 4 N en dioxano (6,0 eq.) a temperatura ambiente durante 1 h. Se concentró la mezcla de reacción y se secó a vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía sobre gel de sílice (el 0-100 % de $CHCl_3/CH_3OH/H_2O$ 90/10/0,5 en $CHCl_3/CH_3OH/H_2O$ 85/15/1,0) para dar F con un rendimiento del 64 % (2 etapas). 1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) gamma 5,14 (m, 1H), 3,81 (t, 2H), 3,36/3,32 (m, 4H), 2,97(d de t, 2H), 1,92 (m, 2H), 1,75 (p, 2H), 1,72 (m, 1H), 1,57 (m, 2H), 1,5-1,3 (m, 14H), 0,95 (t, 3H); ES TOF-EM positiva calc. para $[M+H]^+$ 391,28222, hallada 391,0843.

Ejemplo 3 - Preparación de los compuestos intermedios mostrados en el esquema 4

40 Los compuestos intermedios 1, 2, 40, 41, 42 y 43 (véanse el esquema 4 y la figura 9) se describen adicionalmente en el documento WO2010/018134; la misma numeración de estos compuestos intermedios se usa en el presente documento, tal como se usa en el documento WO2010/018134. CLEM. Los sistemas A-D son tal como se describen en el documento WO2010/018134.

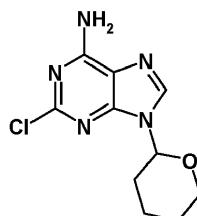
Compuesto intermedio 1: 2,6-Dicloro-9-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-9H-purina

5

A 2,6-dicloropurina (25,0 g) (disponible de, por ejemplo, Aldrich, RU) se le añadió acetato de etilo (260 ml), seguido por ácido *p*-toluenosulfónico (0,253 g). Se calentó la mezcla hasta 50 °C y luego se añadió 3,4-dihidro-2*H*-pirano (16,8 g). Entonces se calentó la mezcla de reacción a 50 °C durante 4 horas. Se evaporó la mezcla de reacción a vacío para dar 2,6-dicloro-9-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-9*H*-purina como un sólido amarillo (36,9 g).

10

¹H-RMN (CDCl_3): δ 8,35 (1H, s), 5,77 (1H, dd), 4,20 (1H, m), 3,79 (1H, m), 2,20-1,65 (6H, m).

Compuesto intermedio 2: 2-Cloro-9-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-9H-purin-6-amina

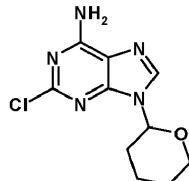
15

Se calentó 2,6-dicloro-9-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-9*H*-purina (36,9 g) con amoniaco 2 M en isopropanol (250 ml) a 50 °C durante 5 horas. Después de reposar a temperatura ambiental durante la noche, se añadió una cantidad adicional de amoniaco 2 M en isopropanol (100 ml) para romper la torta resultante y se calentó la mezcla de reacción durante 9 horas adicionales hasta que se completó la reacción. A la mezcla de reacción se le añadió agua (70 ml) y se separó por filtración el sólido amarillo. Se lavó el sólido con alcohol isopropílico:agua (5:1 (v/v), 60 ml) y luego se secó al aire bajo succión para dar una primera cosecha. El filtrado volvió a filtrarse después de reposar durante la noche para aislar el precipitado y ambos sólidos se secaron a vacío. La primera cosecha era pura mostrando el material de la segunda cosecha una impureza muy minoritaria (señal amplia aislada de 3,5 ppm no observada en la primera cosecha) pero por lo demás era idéntico. Primera cosecha sólida (28,4 g), segunda cosecha sólida (3,42 g).

¹H-RMN (CDCl_3): 8,01 (1H, s), 5,98 (2H, s ancho), 5,70 (1H, dd), 4,16 (1H, m), 3,78 (1H, m), 2,15-1,60 (6H, m solapante).

Compuesto intermedio 2 (método alternativo): 2-Cloro-9-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-9H-purin-6-amina

30



35

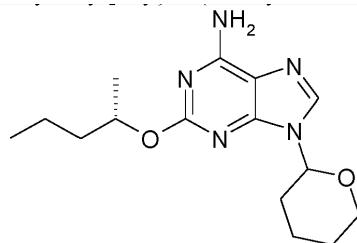
A una disolución de 2,6-dicloropurina (25 g) (disponible de, por ejemplo, Aldrich, RU) en acetato de etilo seco (200 ml) se le añadió ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado (235 mg). Se calentó la reacción hasta 50 °C y se añadió 3,4-dihidro-2*H*-pirano (18,1 ml) de una sola vez. Se permitió que la reacción se agitara a 50 °C durante 1 hora y se eliminó el disolvente a presión reducida. Esto proporcionó un sólido amarillo. Una suspensión de este sólido (~36 g) en amoniaco 2,0 M en isopropanol (460 ml) se calentó bajo nitrógeno a 60 °C durante 4 horas con un condensador acoplado. Se vertió la reacción en agua (50 ml) y se dejó enfriar durante la noche. Se filtró el precipitado y se secó en un evaporador rotatorio (60 °C) durante 30 minutos para proporcionar 2-cloro-9-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-9*H*-purin-6-amina como un sólido blanquecino, 31 g (93 %, 2 etapas).

EM calculada para $(\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{ClN}_5\text{O})^+ = 254, 256$

EM hallada (electrospray): $(\text{M})^+ = 254, 256$ (3:1)

¹H-RMN ((CD₃)₂SO): δ 8,43 (¹H, s), 7,82 (²H, s), 5,55 (¹H, dd), 4,00 (¹H, m), 3,69 (¹H, m), 2,21 (¹H, m), 1,95 (²H, m), 1,74 (¹H, m), 1,56 (²H, m).

5 **Compuesto intermedio 40: 2-[(1S)-1-Metilbutiloxi]-9-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-9H-purin-6-amina**



Método A:

10 Se añadió t-butóxido de sodio (48,5 g, 505 mmol) en porciones a (S)-2-pentanol (185 ml) (disponible de, por ejemplo, Julich Chiral Solutions, Alemania) agitado a temperatura ambiente hasta la homogeneidad (obsérvese que la reacción es exotérmica). Se añadió 2-cloro-9-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-9H-purin-6-amina (32 g, 126 mmol) y se calentó la mezcla de reacción a 70 °C durante 72 horas. Se enfrió la reacción hasta temperatura ambiente y se repartió entre acetato de etilo (500 ml) y agua (500 ml).

20 Se lavó la fase orgánica con disolución saturada de cloruro de sodio (100 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó. Se trituró el residuo con éter y se filtró el material sólido. El precipitado volvió a lavarse con éter y los filtrados se combinaron y se evaporaron. Se disolvió el material en bruto (aprox. 30 g) en DMSO:metanol (1:1) y se purificó mediante cromatografía sobre una columna de fase inversa (C₁₈) (330 g) usando un gradiente del 25-65 % de acetonitrilo (+ TFA al 0,1 %)-agua(+ TFA al 0,1 %) a lo largo de 8 volúmenes de columna, las fracciones se neutralizaron inmediatamente con disolución acuosa saturada de carbonato de sodio. Se combinaron las fracciones apropiadas y se repartieron entre diclorometano e hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado. Se secó la fase orgánica mediante el paso a través de una frita hidrófoba, se filtró y se evaporó para dar 2-[(1S)-1-metilbutiloxi]-9-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-9H-purin-6-amina como una espuma de color crema pálido (14,97 g).

CLEM (sistema B): t_{RET} = 2,21 min; MH⁺ 306

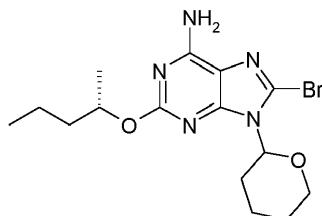
Método B:

30 Se añadió t-butóxido de sodio (206 g, 2,144 mol) a (S)-2-pentanol (720 ml, 6,58 mol) (disponible de, por ejemplo, Julich Chiral Solutions, Alemania) en un matraz de fondo redondo de 2 litros. Se agitó la mezcla y 50 °C hasta que todo el t-butóxido de sodio se había disuelto. Entonces se añadió 2-fluoro-9-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-9H-purin-6-amina (130 g, 548 mmol) en porciones a lo largo de 5 minutos.

35 Después de 3 horas, en análisis de CLEM indicó el consumo completo del material de partida y se vertió la mezcla en hielo-agua (3 l) y luego se extrajo con metil t-butil éter. Esto dio como resultado la formación de una emulsión y se filtró la mezcla a través de Celite y se separó la fase orgánica. Entonces se trató la fase acuosa con NaCl sólido y luego volvió a extraerse con metil t-butil éter. Se combinaron los extractos orgánicos y se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y luego se evaporaron para producir 2-[(1S)-1-metilbutiloxi]-9-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-9H-purin-6-amina como una goma de color marrón pálido (158,59 g).

CLEM (sistema D): t_{RET} = 2,65 min; MH⁺ 306

45 **Compuesto intermedio 41: 8-Bromo-2-[(1S)-1-metilbutiloxi]-9-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-9H-purin-6-amina**

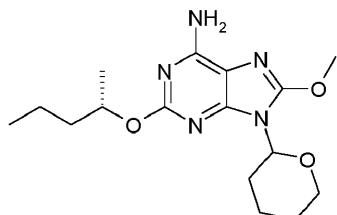


Se añadió N-bromosuccinimida (12,16 g, 68,3 mmol) en porciones a lo largo de 5 min a una disolución agitada de 2-

5 $\{[(1S)-1\text{-metilbutil}]\text{oxi}\}\text{-9-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-9H-purin-6-amina}$ (14,9 g, 48,8 mmol) en cloroformo (80 ml) a <5 °C bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a <5 °C durante 5 horas, luego se lavó con disolución saturada de hidrogenocarbonato de sodio (80 ml), luego agua (80 ml). Se disolvió la espuma en DCM (50 ml) y se lavó con agua (50 ml), luego salmuera (50 ml). Se lavaron las fases acuosas combinadas con DCM (50 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas a través de una frita hidrófoba, y se eliminó el disolvente a vacío para producir 8-bromo-2- $\{[(1S)-1\text{-metilbutil}]\text{oxi}\}\text{-9-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-9H-purin-6-amina}$ como una espuma naranja (18,5 g).

CLEM (sistema D): $t_{\text{RET}} = 3,06 \text{ min}; \text{MH}^+ 384/386$

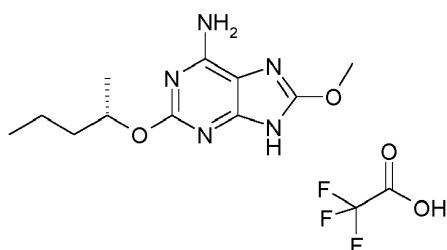
10 **Compuesto intermedio 42: 2- $\{[(1S)-1\text{-Metilbutil}]\text{oxi}\}\text{-8-(metiloxi)-9-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-9H-purin-6-amina}$**



15 Se disolvió 8-bromo-2- $\{[(1S)-1\text{-metilbutil}]\text{oxi}\}\text{-9-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-9H-purin-6-amina}$ (7,1 g, 18,48 mmol) en metanol anhídro (70 ml) y se añadió gota a gota una disolución de metóxido de sodio (25 %) en metanol (8 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se calentó la disolución hasta reflamo a 90 °C durante 4 horas bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió metóxido de sodio adicional en metanol (disolución al 25 %, 3 ml) y se agitó la reacción a 60 °C durante 16 horas adicionales. Se añadió una porción adicional de metóxido de sodio en metanol (disolución al 25 %, 5 ml) y se agitó la reacción a 90 °C durante 7 horas adicionales. Se eliminó el disolvente en el evaporador rotatorio y se repartió el producto en bruto entre EtOAc (75 ml) y disolución saturada de cloruro de amonio (75 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera (75 ml). Se eliminó el disolvente en el evaporador rotatorio para producir 2- $\{[(1S)-1\text{-metilbutil}]\text{oxi}\}\text{-8-(metiloxi)-9-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-9H-purin-6-amina}$ como una espuma de color naranja pálido (6 g).

25 CLEM (sistema D): $t_{\text{RET}} = 3,08 \text{ min}; \text{MH}^+ 336$

Compuesto intermedio 43: Sal de trifluoroacetato de 2- $\{[(1S)-1\text{-metilbutil}]\text{oxi}\}\text{-8-(metiloxi)-9H-purin-6-amina}$



30 Se disolvió 2- $\{[(1S)-1\text{-metilbutil}]\text{oxi}\}\text{-8-(metiloxi)-9-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-9H-purin-6-amina}$ (6 g, 17,89 mmol) en metanol (50 ml). Se añadió gota a gota adenina funcionalizada (20,67 ml, 268 mmol), y se agitó la mezcla a 2 °C durante 72 horas bajo una atmósfera de nitrógeno. Se eliminó el disolvente a vacío y se lavó el sólido resultante con acetato de etilo y se filtró. Se depuró el filtrado y se lavó el residuo con acetato de etilo. Se secaron los residuos sólidos combinados en el horno de vacío durante 2 horas para dar sal de trifluoroacetato de 2- $\{[(1S)-1\text{-metilbutil}]\text{oxi}\}\text{-8-(metiloxi)-9H-purin-6-amina}$ como un sólido blanquecino (5,3 g).

CLEM (sistema C): $t_{\text{RET}} = 0,76 \text{ min}; \text{MH}^+ 252$

40 La preparación de compuestos adicionales útiles como compuestos intermedios en la producción de oxoadeninas, así como la preparación de compuestos de oxoadenina adicionales, se describe en el documento WO2010/018134.

Ejemplo 4: Ensayo para la inducción de interferón-alfa usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas criopreservadas

45 Se usó el siguiente método para someter a prueba compuestos de oxoadenina para determinar su actividad biológica *in vitro*.

Preparación de los compuestos:

Los compuestos se disolvieron en DMSO. Se prepararon diluciones en serie de 2 veces con DMSO y se dispensaron 0,25 µl en placas de polipropileno transparentes Greiner de 384 pocillos.

5 Preparación de PBMC

Se obtuvieron muestras de sangre de hasta 200 ml de donantes humanos sanos. Se superpuso sangre completa en volúmenes de 25 ml sobre gradientes de Ficoll de 15 ml en tubos Leucosep, y se centrifugó a 1000 g durante 20 min. Se retiraron cuidadosamente las células en la banda de la interfase de plasma/Histopaque y se lavaron dos veces con 10 PBS (centrifugadas a 400 g durante 5 min para la recogida). Se resuspendió el sedimento final en medio de congelación (el 90 % de suero inactivado por calor, el 10 % de DMSO) hasta una concentración de células de 4×10^7 células/ml. Las células resuspendidas se criconservaron (congelaron) entonces usando un congelador de velocidad controlada, y se almacenaron a -140 °C durante hasta 4 meses.

15 Incubación y ensayo para determinar el interferón-alfa

Inmediatamente antes del ensayo, se descongelaron rápidamente viales de PBMC criconservadas (congeladas) en un baño de agua a 37 °C. Se preparó una dilución 1:10 de las células en azul trípano y se contó. Las PBMC se diluyeron entonces en medio de crecimiento [RPMI 1640 que contenía suero de ternera fetal al 10 % (Invitrogen), penicilina+estreptavidina (n.º de cat. de Gibco 25030-024, 1:50), L-glutamina 2 mM e IFN-gamma humano recombinante 1000 unidades/ml (n.º de catálogo de Preprotech 300-02)] hasta una densidad de 1×10^6 células/ml, y se dispensaron 50 µl/pocillo a los pocillos (en placas de polipropileno) que contenían o bien 0,25 µl de DMSO o bien compuesto de prueba en 0,25 µl de DMSO. La concentración final superior de compuesto fue normalmente de 50 uM o 5 uM (para obtener un ajuste de la curva para compuestos sumamente activos). Las placas se incubaron durante 25 24 h a 37 °C en el 5 % de CO₂.

Se usó un inmunoensayo de múltiples isoformas para cuantificar IFN-alfa en sobrenadantes de PBMC. Se diluyó anticuerpo polyclonal de conejo contra IFN-alfa humano (número de catálogo 31101, Stratech Scientific) 1:10000 en tampón de ensayo (RPMI 1640 que contenía suero de ternera fetal al 10 %, Invitrogen) y se añadieron 20 µl a cada pocillo de una placa de pocillos GAR (recubiertos con anticuerpo de cabra anti-conejo) de un solo punto pequeño de MSD (Meso-Scale Discovery, Gaithersburg, MD, EE. UU.). Se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación vigorosa. Después de tres lavados con PBS, se añadieron 20 µl de sobrenadante celular a cada pocillo de la placa. Entonces se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación vigorosa. Se marcaron un par de anticuerpos monoclonales frente a IFN-alfa (número de catálogos 21100 y 21112, Stratech Scientific) con SULFO-TAG (TM) (MSD), se diluyeron 1:1000 en tampón de ensayo y se añadieron 20 µl a cada pocillo de la placa. Se incubó además la placa durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación vigorosa. Después de tres lavados con PBS, se añadieron 30 µl de x2 tampón T (MSD) a cada pocillo y se leyó la placa en un lector de placas MSD Sector 6000.

40 Se normalizaron los datos a los controles internos de la placa de resiquimod 1 uM (n=16) y DMSO (n=16). Se derivaron los valores de pCE50 mediante un ajuste de la curva de 4 parámetros con IRLS (mínimos cuadrados reponderados iterativamente) en el software ActivityBase, a partir de una dilución en serie de dos veces, de 11 puntos de los compuestos de prueba.

45 Ejemplo 5: Ensayo para la inducción de interferón-alfa y TNF-alfa usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas recientes**Preparación de los compuestos**

50 Los compuestos se disolvieron en glicerol al 2 % en agua hasta concentraciones de trabajo que comenzaban en 10 µM, diluidas en serie hasta 0,00013 µM con diluciones de 5 veces. Esta preparación de compuesto se añadió a placas de fondo plano de 96 pocillos a un volumen de 10 µl. Se añadieron 10 µl adicionales de medio a estos pocillos, u otra preparación de compuesto, si estaba prevista una coestimulación.

55 Preparación de PBMC

Se recogieron muestras de sangre de donantes humanos en jeringas de 60 cm³ heparinizadas, y se dividieron en alícuotas de 20 ml en tubos de cultivo cónicos de 50 ml. Las alícuotas de sangre completa se diluyeron entonces con 15 ml de PBS, y luego se recubrieron con 15 ml de HISTOPAQUE(TM). Se centrifugaron las muestras a 800 g durante 60 30 min sin freno y se retiró cuidadosamente la interfase de la capa leucocitaria. Se centrifugaron las células recogidas a 1500 rpm durante 5 minutos y se resuspendió el sedimento en 10 ml de PBS. Se agruparon las células y se lavaron adicionalmente dos veces en PBS para eliminar todo el HISTOPAQUE(TM) de las muestras. Después del lavado final, se llevaron las células combinadas a 20 ml de medio completo (RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado con calor al 10 % v/v, penicilina G 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, L-glutamina 10 mM), se contaron

usando un contador de células automatizado Countess (Invitrogen, Life Technologies) y se diluyeron para dar una concentración final de $2,8 \times 10^6$ /ml. Se añadió esta suspensión celular a la placa de cultivo que contenía las preparaciones de compuestos (véase anteriormente), a un volumen de 180 μ l, dando como resultado un volumen de pocillo total de 200 μ l.

5

Incubación y ensayos para determinar interferón-alfa y TNF-alfa

Después de 24 h de incubación (37 °C, el 95 % de aire, el 5 % de CO₂), se retiraron cuidadosamente los sobrenadantes y se sometieron a ensayo para determinar la inducción de citocinas/quimiocinas usando kits múltiplex (kits múltiplex FLUOROKINE(TM) de R&D Systems [bio-technne], Mineápolis, MN) y kit de ELISA VERIKINE(TM) de IFN α humano (Pestka Biomedical Laboratories, Inc., Piscataway, NJ).

Ejemplo 6: Ensayo de citocinas dirigido por alérgeno usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas recientes de voluntarios atópicos

10

Se desarrolló un ensayo basado en el cocultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) derivadas de donantes humanos atópicos con alérgeno y compuestos de prueba. Después de 5-6 días de cultivo, se sometieron a ensayo los sobrenadantes celulares para determinar una gama de citocinas.

15

Preparación de los compuestos

Se disolvieron los compuestos en DMSO, luego se diluyeron en serie en medio de crecimiento (medio RPMI 1640 suplementado con penicilina G 100 U/ml, estreptomicina 100 μ g/ml, L-glutamina 10 mM) para dar 4x el intervalo de concentración requerido en presencia de DMSO al 0,04 %. Cada compuesto se sometió a ensayo por triplicado a todas las concentraciones.

Preparación de PBMC

20

Se centrifugó sangre humana desfibrinada de voluntarios que se sabe que son alérgicos a la hierba timotea a 2500 rpm durante 15 minutos. Se recogió la capa superior de suero y se inactivó con calor a 56 °C durante 30 minutos (suero autólogo HI). La capa inferior de células se resuspendió en 50 ml de PBS (+Ca +Mg), se superpusieron 25 ml de sangre diluida sobre 20 ml de LYMPHOPREP(TM) en tubos de 50 ml, luego se centrifugaron a 2500 rpm durante 20 minutos a TA. Se retiró cuidadosamente la banda en la interfase de suero/LYMPHOPREP(TM). Las células recogidas se lavaron con PBS y se resuspendieron a 4×10⁶/ml en medio de crecimiento con suero autólogo HI. Se sembraron PBMC a 0,4×10⁶ células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano en presencia de antígeno de hierba timotea 10 ug/ml (Alk-Abello, Dinamarca) y compuestos de prueba a concentraciones apropiada en un volumen total de 200 ul.

Incubación y ensayos de citocina

25

Se incubaron las placas a 37 °C en el 5 % de CO₂ durante hasta 6 días. Se recogió el medio células de cada pocillo y se almacenó a -20 °C antes de su análisis. Se detectaron citocinas y quimiocinas en los sobrenadantes usando placas de 10 puntos MESO SCALE DISCOVERY™ para citocinas TH1/Th2 humanas.

Ejemplo de referencia 7: Actividad sobre TLR7/8 de las oxoadeninas 3a - 3g

30

La actividad sobre TLR7/8 humano (h) de las oxoadeninas 3a-g se evaluó mediante un ensayo de gen indicador usando células HEK293 transfectadas de manera estable con o bien hTLR7 o bien hTLR8, y con el indicador NF κ B SEAP (fosfatasa alcalina embrionaria secretada, *secreted embryonic alkaline phosphatase*).

35

Se obtuvieron células HEK293 que expresan TLR7 o TLR8 humano, y el gen indicador SEAP sensible a NF κ B, de InvivoGen (San Diego, CA). Estas células se mantuvieron en medios de cultivo de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Grand Island, NY), suero bovino fetal al 10 % (FBS) (Sigma, St. Louis, Missouri) y antibióticos de selección (Invitrogen e InvivoGen). Las células HEK293 transfectadas de manera estable se sembraron en placa en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos a 1^{E5}/pocillo y se estimularon durante 24 h con un intervalo de dosis de formulaciones acuosas de compuestos que comienzan a 200 μ M, diluidas en serie hasta 0,012 μ M con diluciones de 2 veces (a menos que las condiciones de formulación justifiquen concentraciones de partida inferiores). Se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se sometieron a ensayo para determinar la activación de NF κ B usando el kit de detección de SEAP colorimétrico QUANTI-BLUE (una marca comercial de InvivoGen).

40

El ensayo midió la producción de SEAP mediada por NF κ B tras la activación específica de TLR7 o TLR8. La especificidad y potencia (CE₅₀) de hTLR7 y hTLR8 de las oxoadeninas 3a-g se muestran en las figuras 1A-C.

Debe indicarse que el ensayo de HEK no es óptimo para evaluar TLR7 puesto que TLR7 señaliza por medio de las rutas de tanto NF κ B (conduciendo a inducción de citocinas inflamatorias) como de IRF7 (conduciendo a inducción de

- IFN) y el sistema de HEK solo mide el lado de NFkB de la señalización TLR7. La oxoadenina 3a no fue activa sobre hTLR7 o hTLR8 pero las otras oxoadeninas 3b-g fueron todas activas. Aunque el aumento de la longitud del ligador más allá de 1 carbono aumentó la potencia de hTLR7, no se observó una correlación lineal entre la longitud del ligador de carbono y la potencia de hTLR7 en este ensayo. La oxoadenina 3f con ligador de 5 carbonos fue el agonista de hTLR7 más potente de la serie (véase la figura 1C) mientras que la oxoadenina 3b con ligador de 1 carbono fue el agonista de hTLR8 más potente de la serie disminuyendo la potencia de hTLR8 significativamente con ligadores de carbono más largos.
- La pérdida de actividad de hTLR8 observada después de la estimulación con dosis superiores de las oxoadeninas 3e-g sugirió una posible toxicidad celular en células HEK293-hTLR8. Se usó la tinción acuosa fijable LIVE/DEAD(TM) para evaluar la muerte celular potencial tras la estimulación de HEK293-hTLR8 con las oxoadeninas 3e-g. Se observó una toxicidad celular significativa a dosis superiores de las oxoadeninas 3e-g (datos no mostrados). Esta toxicidad celular no se observó después de 24 horas de estimulación con las oxoadeninas 3b-d de ligador de carbono más corto (datos no mostrados).
- La inducción de citocinas en células mononucleares de sangre periférica humanas (hPBMC) después de 24 horas de estimulación con las oxoadeninas 3e-g se evaluó a continuación usando ELISA de citocinas y tinción de citocinas intracelulares (ICS). La inducción de TNF α se muestra en la figura 2A. Se observó un claro aumento en la secreción de TNF α con el aumento de la longitud de carbono, con una secreción de TNF α máxima observada para el ligador de cinco carbonos.
- Se usó también ICS para examinar el estado de activación y las contribuciones de citocinas de distintos subconjuntos de células. Se observó un patrón similar en células dendríticas mieloídes (mDC) al comparar la inducción de IL-6 (figura 2B), TNF α e IFN γ . Tomados conjuntamente, estos datos sugieren fuertemente un aumento de citocinas proinflamatorias a medida que el ligador de carbono aumenta hasta cinco carbonos. La oxoadenina 3g con ligador de 6 carbonos indujo menos TNF α que 3f pero más que la oxoadenina 3e con ligador de 4 carbonos.
- También se evaluó la inducción de IFN α a partir de hPBMC tras la estimulación con las oxoadeninas 3a-g. Dada la relación no lineal observada entre la longitud del ligador de carbono y los valores de CE₅₀ de hTLR7 obtenidos con las oxoadeninas 3a-g en el sistema de HEK293 (que es indicativo del lado de NFkB de la señalización de TLR7), se esperaba que la inducción de IFN α a partir hPBMC fuera más representativa de la actividad sobre hTLR7 de estos compuestos. Se observó un patrón único para la expresión de IFN α para los compuestos 3a-g (figura 3).
- Cada uno de los compuestos 3a-g presentó una curva de respuesta a la dosis en forma de campana desde el pico hasta la base dentro de un intervalo de dosis de 100 μ M, excepto la oxoadenina 3a, que fue inactiva. Oxoadeninas con una longitud del ligador de carbono creciente fueron un inductor de IFN α cada vez más potente, tal como se indica mediante la dosis inferior requerida para lograr una respuesta de IFN α máxima, pero concentraciones superiores de oxoadeninas estaban asociadas con una disminución sensible a la dosis en IFN α . Simultáneamente, los niveles de TNF α en los mismos sobrenadantes de cultivo celular aumentaron de un modo dependiente de la dosis. pDC es el tipo de célula principal responsable de >90 % de la secreción de IFN α , por tanto, la supresión de la ruta de señalización de TLR7-IRF7 por medio de un bucle de retroalimentación reguladora para restringir la magnitud de la activación de IFN α o muerte celular inducida por activación (AICD) específica del tipo de célula podría ser responsable del patrón de citocinas único observado en este estudio.
- Para evaluar estas hipótesis, se estimularon hPBMC con diversas dosis de 3b (ligador de 1 carbono) o 3f (ligador de 5 carbonos) y se evaluaron las células para determinar la apoptosis inducida por activación mediante tinción con anexina-V. 3f estaba asociada con un aumento dependiente de la dosis en la tinción de anexina-V en pDC pero no en mDC. En cambio, solo la dosis más alta de 3b (10 mM) estaba asociada con células positivas para anexina-V en ambos subconjuntos de pDC y mDC. Esta apoptosis específica del tipo de célula observada se correlacionaba con las curvas de inducción de IFN α y TNF α dependientes de la dosis.
- Para confirmar adicionalmente el efecto de la apoptosis de pDC sobre la inducción de IFN α , se evaluó la coestimulación con cantidades equimolares de 3b y 3f en hPBMC. Tal como se esperaba, la combinación de una alta dosis (~0,3 μ M) de 3f y 3b redujo el pico de IFN α en comparación con 3b sola, mientras que la combinación de una dosis inferior de 3f y 3b (~0,003 μ M) no alteró la respuesta al pico de IFN α por 3f sola (datos no mostrados). Globalmente, estos resultados demuestran que el aumento del ligador de carbono desde 1 hasta 5 carbonos aumenta la potencia de la inducción de IFN α a partir de pDC pero también reduce el umbral de dosis para la apoptosis al tiempo que deja la inducción de TNF α a partir de mDC en gran medida inalterada.
- En resumen, se investigó la relación de estructura-actividad de siete oxoadeninas (3a-3g) sustituidas en la posición 9 con un resto piperidinilalquilo. Se requirió un mínimo de un ligador de 1 carbono para la actividad sobre hTLR7 y hTLR8. La oxoadenina con ligador de 5 carbonos fue el agonista de hTLR7 más potente mientras que el ligador de 1 carbono fue el agonista de hTLR8 más potente de la serie. Las citocinas proinflamatorias y la inducción de IFN α en hPBMC aumentaron con el aumento de la longitud de carbonos hasta 5 carbonos, siendo la oxoadenina con el ligador

de 5 carbonos el inductor de citocinas más potente. Estos resultados indican que es posible modular la actividad e hTLR7/8 y la inducción de citocina en la serie de oxoadeninas con grupos no aromáticos en N-9 usando una modificación estructural menor.

5 **Ejemplo 8: Especificidad de TLR7 y TLR8 y potencia del compuesto 3x**

Se muestra que el compuesto 3x tiene una potencia de TLR7 mejorada y actividad agonista sesgada hacia TLR7 en comparación con otras oxoadeninas investigadas.

- 10 En relación con la oxoadenina 3b, los compuestos 3f y 3x tienen una potencia de TLR7 50 y 100 veces mayor, respectivamente (figura 4A), y una actividad sobre TLR8 menor (figura 4B). La influencia del sustituyente C2 puede observarse comparando 3f y 3x: la introducción de un grupo (S)-metilo en el primer carbono de la cadena de C2-butoxilo aumentó la actividad sobre tanto TLR7 como TLR8.
- 15 Cuando se evaluó la inducción de citocinas en hPBMC, los compuestos 3f y 3x mostraron una alta potencia (DE₅₀ inferior) y respuesta de TNF-alfa (figura 5). Se observó el mismo resultado para otras citocinas proinflamatorias (datos no mostrados).

Tal como se esperaba basándose en la baja DE₅₀ de TLR7 observada en el ensayo de HEK293 para los compuestos 20 3f y 3x, ambas oxoadeninas indujeron IFN-alfa a dosis muy bajas (intervalo ~1 nM) (figura 6).

La figura 7 muestra la inducción de IFN-alfa por oxoadeninas tal como se mide mediante ICS. Se analizó la inducción de citocinas mediante el porcentaje de células pDC vivas totales positivas para IFN-alfa. Las dosificaciones usadas fueron 360 picomolar, 11 nanomolar, 330 nanomolar y 10 micromolar.

25 Tal como se observó anteriormente con otras oxoadeninas (véase el documento WO2010/018134), la sinergia con AGP CRX601 para IL12-p70 fue relativamente baja en comparación con el compuesto de imidazoquinolina CRX642 (véanse los documentos WO2010/048520; PCT/US2009/061867; US 8.624.029) en combinación con CRX601. Sin embargo, los compuestos 3x y 3f demostraron sinergia con CRX601 en todo un amplio intervalo de dosis (figuras 8A y 8B).

30 La tabla 2 resume los datos comentados anteriormente. Obsérvese el compuesto 3x por su baja DE₅₀ de TLR7 y alta inducción relativa de IFN-alfa e IL-12p70.

35

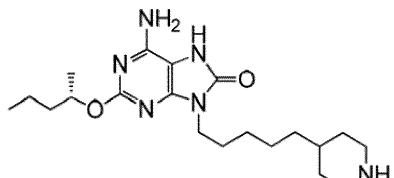
Tabla 2

HEK 293				PBMC / monocitos		
	DE ₅₀ de TLR7 (μM)	DE ₅₀ de TLR8 (μM)	Razón TLR 7/8	IL-12p70 w/601	IFNα	Citoc. * infl.
3f	0,026	99,85	3E-04	**	* /****	***
3x	0,006	93,97	1E-04	**	* /****	* /***

hasta ****: nivel de inducción de citocinas más bajo a más alto.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto 6-amino-9-[5-(4-piperidinil)pentil]-2-[(1S)-1-metilbutiloxi]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona:



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 10 2. Compuesto según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de enfermedades alérgicas u otras afecciones inflamatorias.
3. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1, y uno o más diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.
- 15 4. Composición inmunogénica que comprende un compuesto según la reivindicación 1, y un antígeno o composición antigénica.
5. Compuesto según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de enfermedades alérgicas u otras afecciones inflamatorias, enfermedades infecciosas o cáncer.
- 20 6. Composición que comprende un compuesto según la reivindicación 1, y que comprende además un componente seleccionado de: (a) al menos otro agente terapéuticamente activo, (b) un diluyente farmacéuticamente aceptable y (c) un portador farmacéuticamente aceptable.
- 25 7. Composición que comprende un compuesto según la reivindicación 1 para su uso en terapia.
8. Compuesto según la reivindicación 1 para su uso en terapia.

FIG. 1A

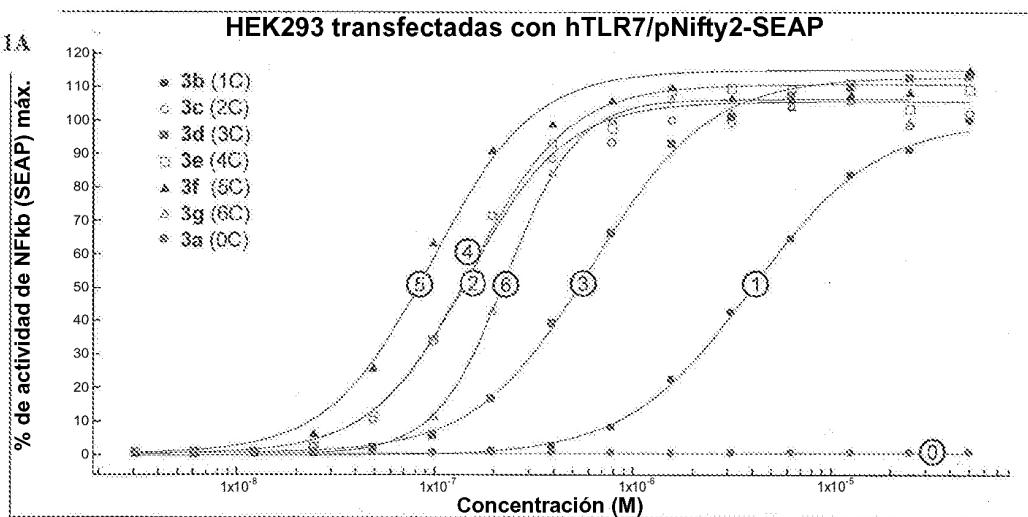


FIG. 1B

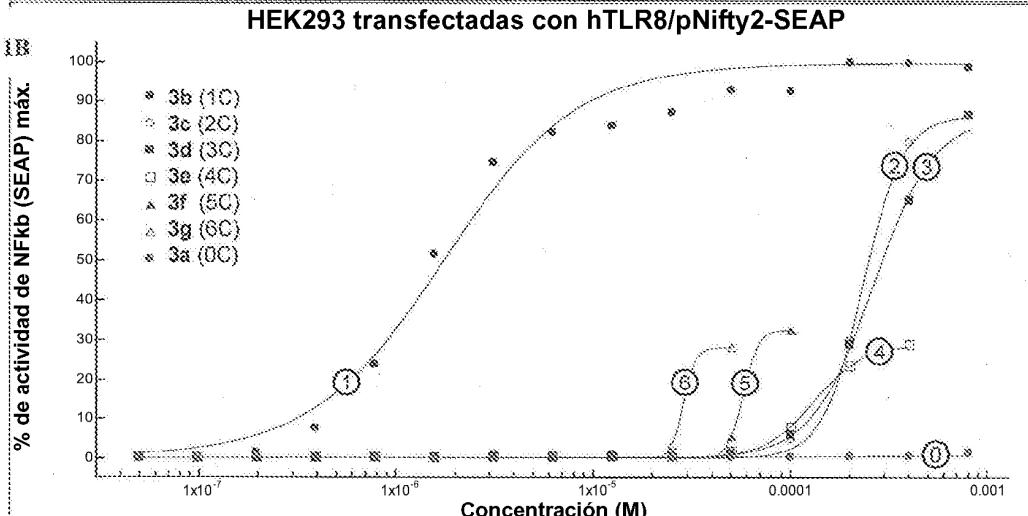


FIG. 1C

	3a	3b	3c	3d	3e	3f	3g
CE ₅₀ de hTLR7 (μ M)	--	4.0	0.15	0.62	0.15	0.10	0.23
CE ₅₀ de hTLR8 (μ M)	--	1.8	231	260	131	57	29

FIG. 2A

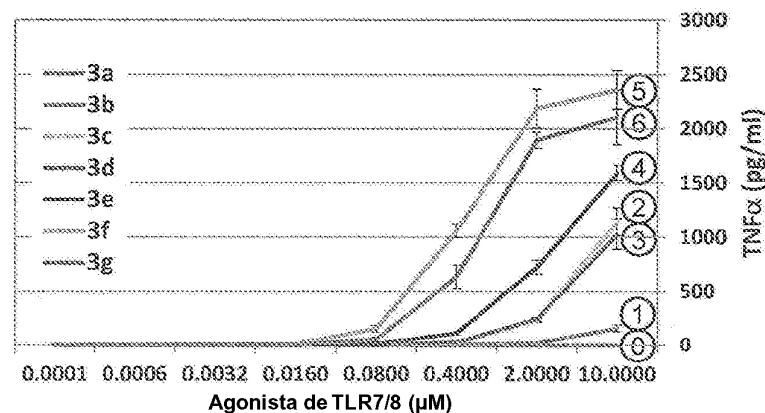


FIG. 2B

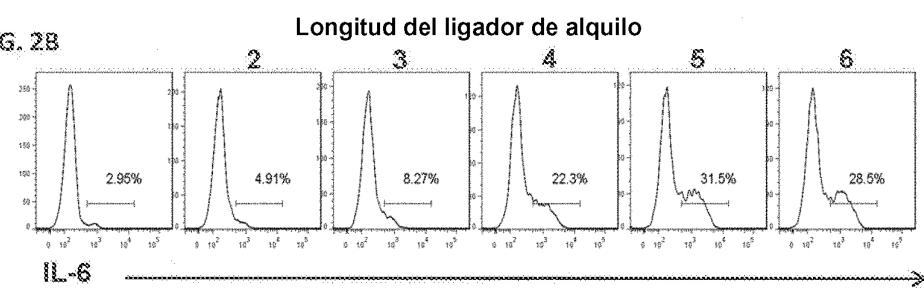


FIG. 3

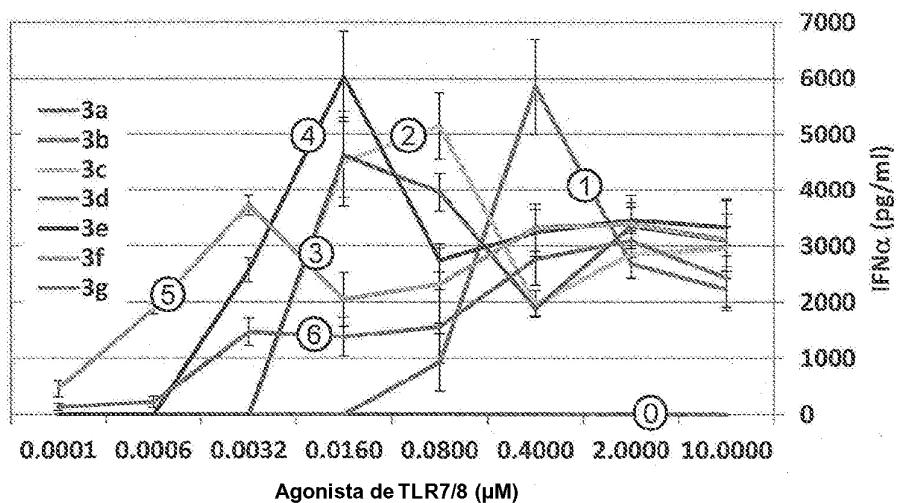
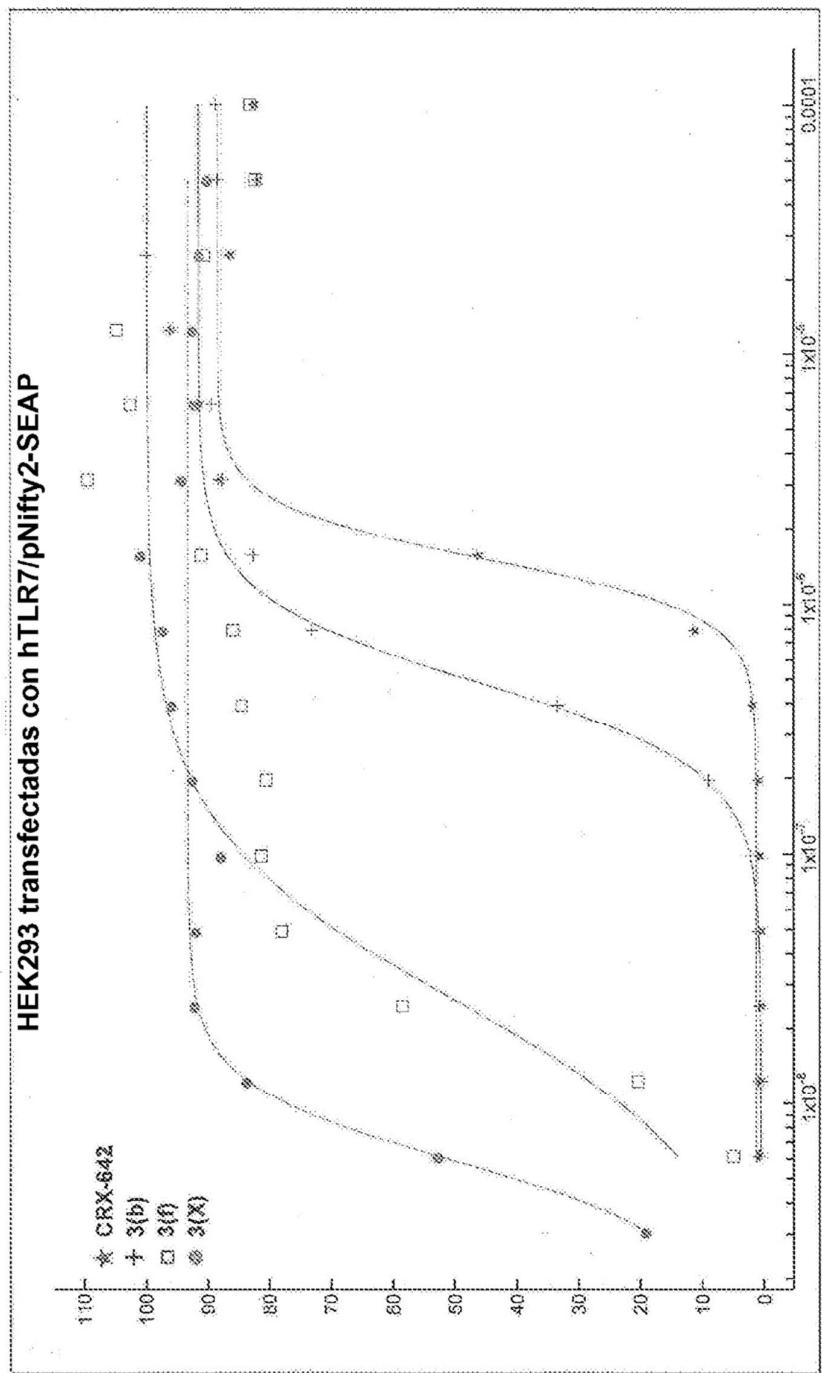


FIG. 4A



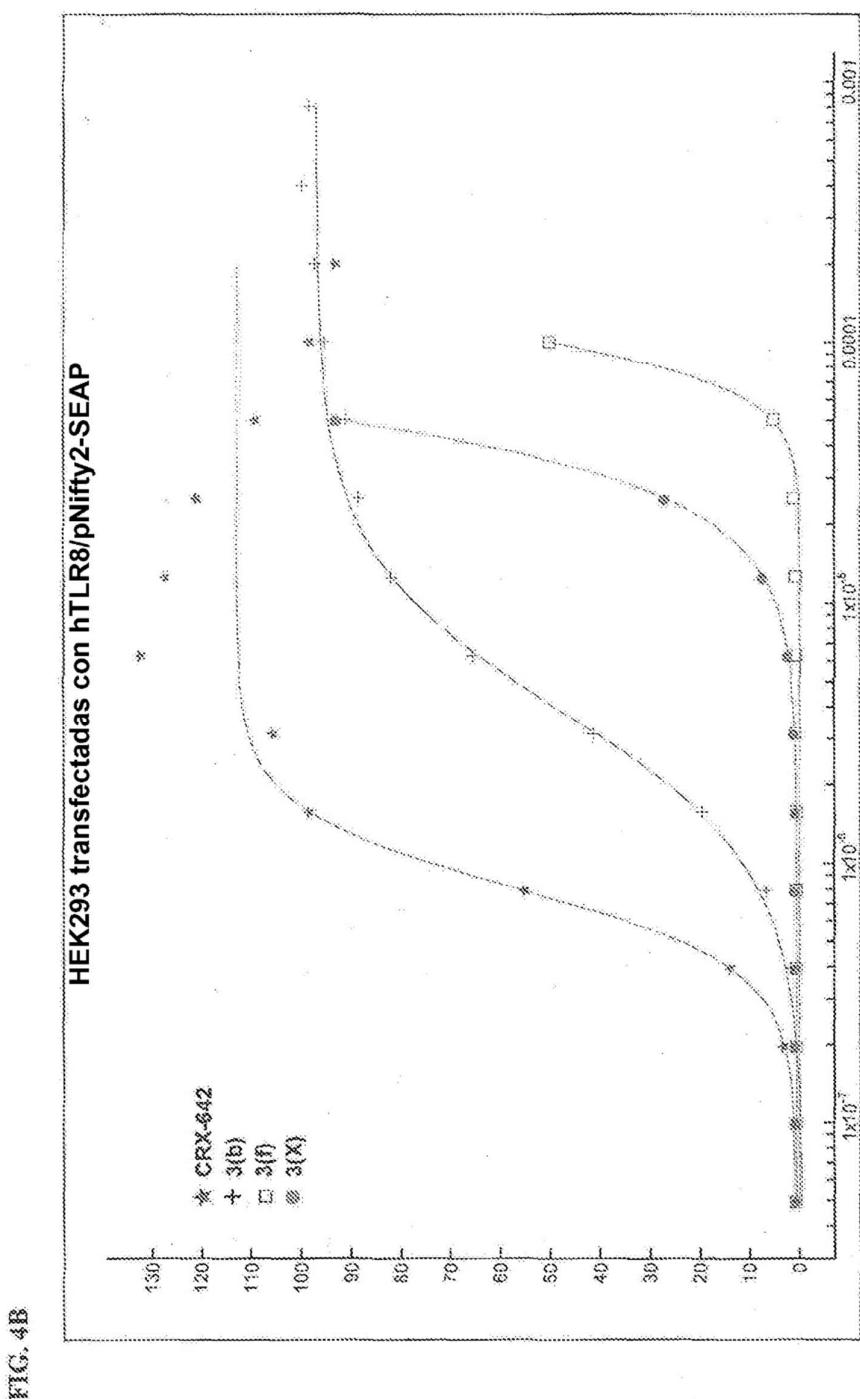


FIG. 4B

FIG. 5

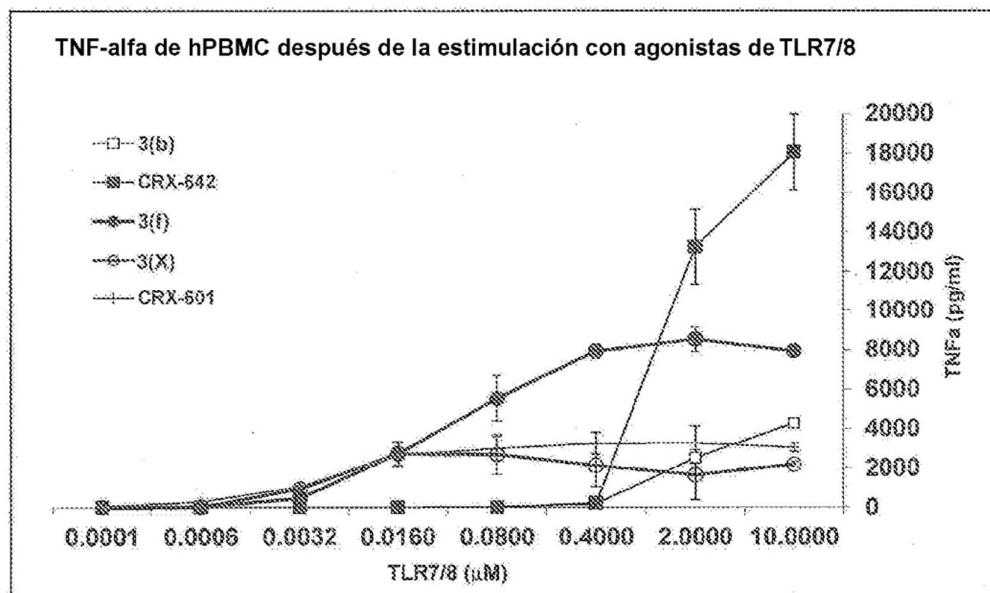
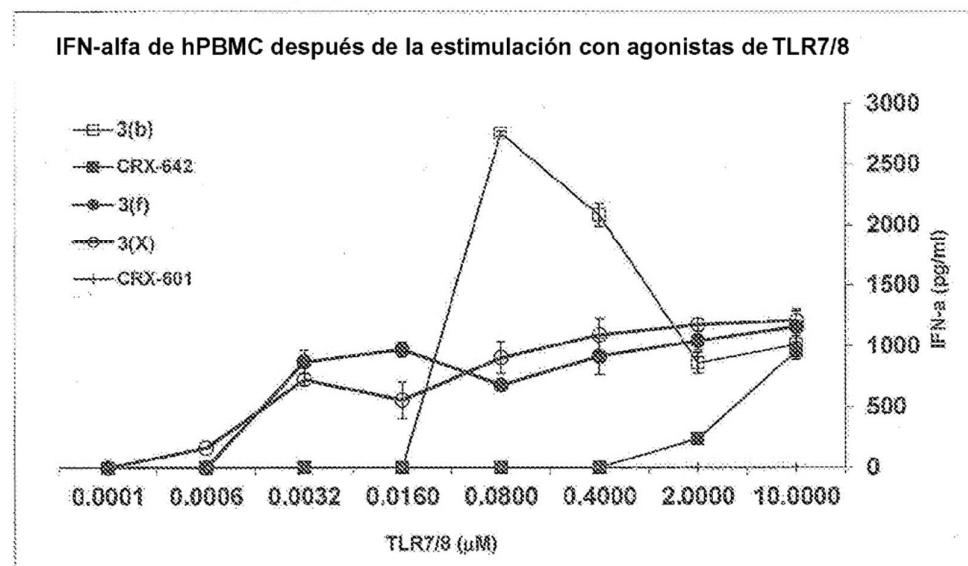


FIG. 6



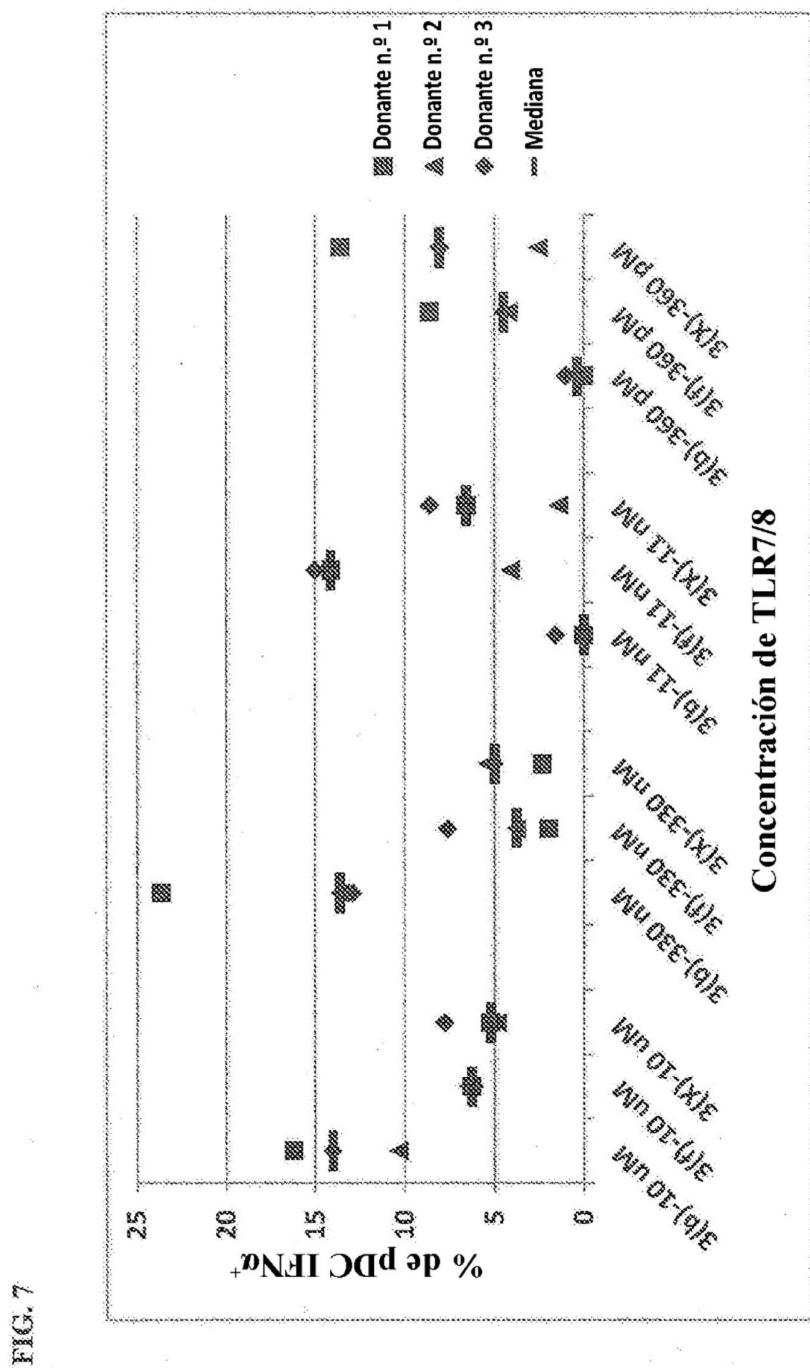


FIG. 7

FIG. 8A

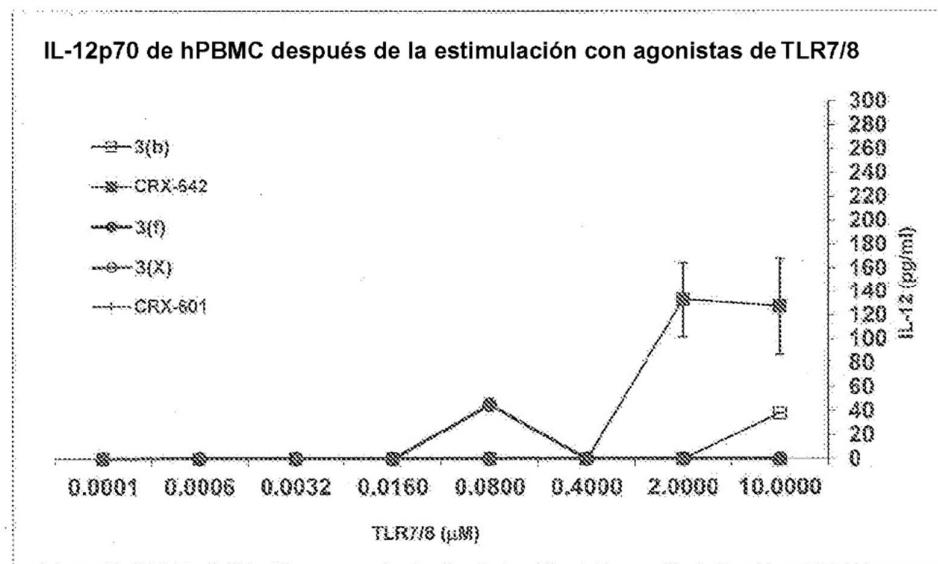


FIG. 8B

