

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 944 541**

51 Int. Cl.:

**C07D 307/78** (2006.01)

**C07D 209/04** (2006.01)

**C07D 209/12** (2006.01)

**A61K 31/343** (2006.01)

**A61K 31/404** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2015 PCT/US2015/043830**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16022700**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2015 E 15830729 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2023 EP 3177601**

54 Título: **Ayuvantes de molécula pequeña independientes de TLR**

30 Prioridad:

**06.08.2014 US 201462033918 P**

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

**22.06.2023**

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (50.0%)  
10550 North Torrey Pines Road  
La Jolla, CA 92037, US y  
BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
TEXAS SYSTEM (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BEUTLER, BRUCE y  
BOGER, DALE L.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 944 541 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

Adyuvantes de molécula pequeña independientes de TLR

## 5 APOYO GUBERNAMENTAL

La presente invención se realizó con apoyo gubernamental conforme a la subvención AI082657 de los Institutos Nacionales de Salud/Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

## 10 CAMPO TÉCNICO

La presente invención contempla un compuesto adyuvante de molécula pequeña, y en particular un grupo de compuestos bien definidos que inducen la secreción de TNF- $\alpha$  en preparaciones de macrófagos y proporcionan inmunoestimulación sin la intervención aparente de una o más moléculas de la familia TLR.

## ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa contra la infección y se cree que está mediado principalmente por células inmunitarias fagocíticas, como los macrófagos y las células dendríticas. Estas células reconocen microorganismos a través de un número limitado de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) codificados en la línea germinal que reconocen componentes microbianos conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos, que son esenciales para la supervivencia del microorganismo y, por lo tanto, difíciles de alterar para el microorganismo.

25 Varias clases de PRR, incluyendo los receptores tipo Toll (TLR) localizados en la superficie celular y los receptores citoplasmáticos, reconocen distintos componentes microbianos y activan directamente las células inmunitarias, desencadenando cascadas de señalización intracelular que inducen rápidamente la expresión de una variedad de citoquinas inflamatorias que inician una variedad de respuestas inmunitarias superpuestas. Se han identificado por lo menos trece TLR diferentes en animales que van desde moscas de la fruta hasta humanos y ratones [Beutler, Blood, 113:1399-1407 (2009)]. Uno de los PRR más conocidos es TLR4, que reconoce el principal lipopolisacárido (LPS) componente superficial bacteriano Gram negativo [Akira et al., Cell 124:783-801 (2006)]. Consultar también, Beutler, Blood, 113:1399-1407 (2009), y Moresco et al., Curr. Biol. 21(13):R488-93, (2011) y las citas en los mismos para una perspectiva histórica de la investigación realizada para encontrar TLR y determinar la función de los TLR.

La mayoría de los TLR son multímeros funcionales. Algunos son heteroméricos. Algunos parecen ser homoméricos y, en algunos casos, las subunidades que no son TLR son parte del complejo de señalización. Por ejemplo, TLR4 parece no detectar LPS directamente, sino solo como un complejo con MD-2, una pequeña proteína secretada que está estrechamente asociada con el ectodominio de TLR4. El análisis cristalográfico ha mostrado la naturaleza de la interacción entre ligandos de TLR específicos y los receptores tipo Toll, incluyendo las interacciones entre LPS y el complejo MD-2:TLR4. Beutler, Blood 113:1399-1407 (2009).

Los estudios sobre la señalización de TLR4 en monocitos, macrófagos y células dendríticas han revelado que la participación del complejo MD-2:TLR4 (en lo sucesivo, simplemente "TLR4", para facilitar la expresión) por LPS desencadena una cascada de señalización que implica varios factores transcripcionales intracitoplasmáticos y nucleares. La activación de TLR4 implica primero a un conjunto de miembros de la familia de adaptadores que enlazan TLR4 con las serina/treonina quinasas. Estas quinasas median la fosforilación y la ubiquitinación de varios sustratos, lo que finalmente da como resultado la activación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B, que regula la expresión de varias citoquinas inmunomoduladoras [Kwai et al., Cell Death Differ 13:816-825 (2006)].

Se han usado el adyuvante de Freund (micobacterias en aceites minerales o vegetales), el hidróxido de aluminio ("alumbre") y LPS (lipopolisacárido) para aumentar las respuestas de anticuerpos a las proteínas coadministradas. En los Estados Unidos, solo el alumbre está aprobado para su uso en vacunas humanas.

De estos adyuvantes, solo el LPS y su lípido A derivado tienen un objetivo bien definido: TLR4, pero la toxicidad de estos ligandos de TLR4 es considerable, así como su inestabilidad *in vivo* y no se conjugan fácilmente con antígenos.

En un trabajo que proporciona un poderoso paradigma para el descubrimiento de adyuvantes sintéticos "no naturales", identificamos una nueva clase de adyuvantes robustos de moléculas pequeñas que: (1) surgieron de la selección de una biblioteca mimética de hélice  $\alpha$ , (2) actúan mediante un mecanismo indefinido que es independientemente de TLR4, (3) son fáciles de producir y manipular estructuralmente, (4) no son tóxicos y (5) provocan respuestas mejoradas y cualitativamente diferentes de LPS. Tales adyuvantes pueden usarse para la coadministración o para la vacunación unida covalentemente contra cualquier microbio susceptible a la inmunización

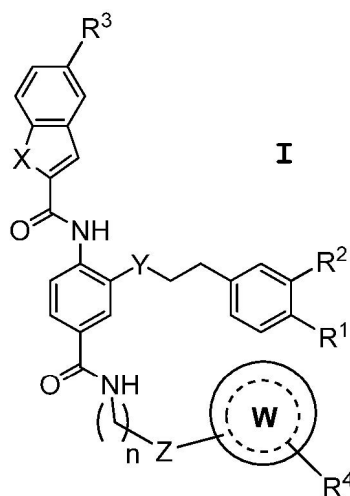
protectora basada en anticuerpos.

La US 2012/148660 A1 divulga agonistas de TLR y conjugados de los mismos supuestamente útiles en vacunas y en la prevención, inhibición o tratamiento de una variedad de trastornos.

La WO 2007/024707 A2 divulga conjugados agonistas de TLR (compuestos) y composiciones supuestamente útiles para activar el sistema inmunitario de un mamífero.

#### BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. La presente invención contempla un compuesto inmunoadyuvante independiente de TLR4 que no muestra la toxicidad de LPS a la vez que muestra activación de muchas vías de señalización celular similares. Un compuesto contemplado corresponde en estructura a la Fórmula I, a continuación, o su sal farmacéuticamente aceptable,



en donde:

**X** es O, S, NR<sup>5</sup>, o CH<sub>2</sub>, donde R<sup>5</sup> es hidrido (H), o hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

**Y** es O, CH<sub>2</sub> o está ausente;

**Z** es O, S, NR<sup>6</sup>, o CH<sub>2</sub>, donde R<sup>6</sup> es hidrido (H), o hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

**n** es un número que es cero, 1 o 2, pero **n** solo es cero cuando **Z** es CH<sub>2</sub>;

R<sup>1</sup> es H u OH, R<sup>2</sup> es H u OH, o R<sup>1</sup> es OH y R<sup>2</sup> es OH, pero por lo menos uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> es OH;

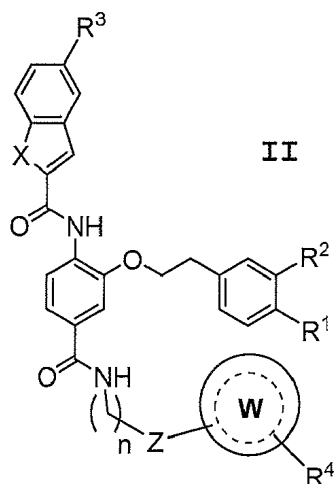
R<sup>3</sup> es hidrido (H), halógeno (F, Cl o Br), azido (N<sub>3</sub>), hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o trifluorometilo (CF<sub>3</sub>);

R<sup>4</sup> es hidrido, halógeno, azido, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o trifluorometilo;

**W** es una estructura de anillo, preferiblemente una estructura de anillo aromático, que contiene uno o dos anillos e incluye de 5 a 12 átomos en la estructura del anillo. Esa estructura de anillo **W** contiene opcionalmente a) 1, 2, 3 o 4 heteroátomos que son independientemente oxígeno, nitrógeno o azufre, y contiene b) de uno a tres grupos sustituyentes (a los que se hace referencia colectivamente como R<sup>4</sup>) que incluyen uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidrido (H), hidroxilo (OH), hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, halógeno y trifluorometilo unidos a uno o más átomos del anillo. Una línea de puntos (---) representa uno o más enlaces etilénicos (-C=C-) presentes opcionalmente.

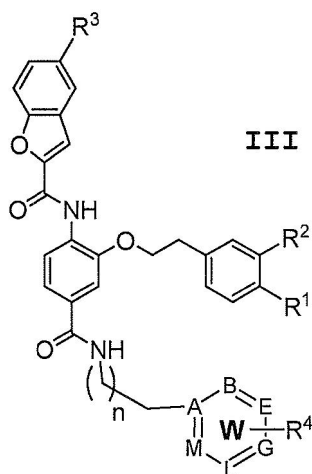
En preferencias separadas en cuanto a un compuesto de Fórmula I, a) **X** es O o NR<sup>5</sup> y b) **Y** es O.

Un compuesto preferido de Fórmula I es un compuesto de Fórmula II, a continuación. En la Fórmula II, **W**, **Z**,



$n$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  son como se definen para la Fórmula I, y  $X$  es O o  $NR^5$ . Preferiblemente, en un compuesto de Fórmula II, la estructura de anillo  $W$  es una estructura de anillo aromático única de seis miembros (grupo arilo o heteroarilo),  $X$  es O y  $Z$  es  $CH_2$ .

Un compuesto preferido de Fórmula II corresponde por tanto en estructura a la Fórmula III, a continuación, donde



$n$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son como se definen en la Fórmula I. Aquí,  $W$  es una estructura de anillo aromático de seis miembros cuyos átomos de anillo: A, B, E, G, L y M son átomos de carbono (C) o de nitrógeno (N), con no más de dos de A, B, E, G, L y M siendo nitrógeno.

Preferiblemente, la estructura de anillo aromático de seis miembros  $W$  es un anillo de fenilo y  $R^4$  es un único sustituyente que es un halógeno meta o para-sustituido, azido, hidrocarbilo  $C_1-C_4$ , hidrocarbilo  $C_1-C_4$  o un grupo trifluorometilo. En otra preferencia,  $R^2$  es hidrido y  $R^1$  es hidroxilo.

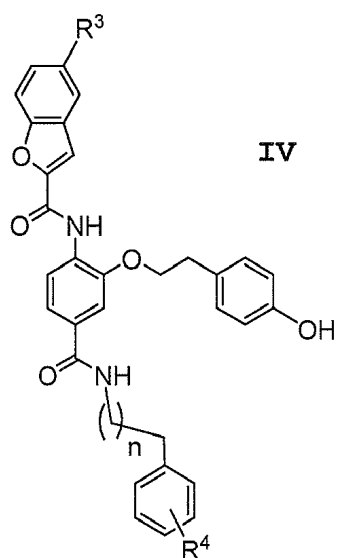
Un compuesto preferido de Fórmula III corresponde por tanto en estructura a la Fórmula IV, a continuación, donde  $n$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son como se han definido anteriormente.

5

10

15

20



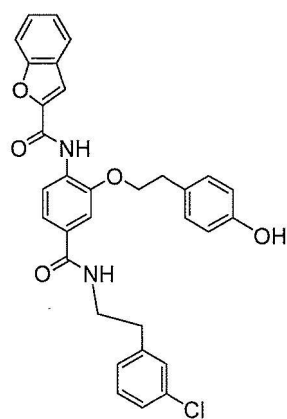
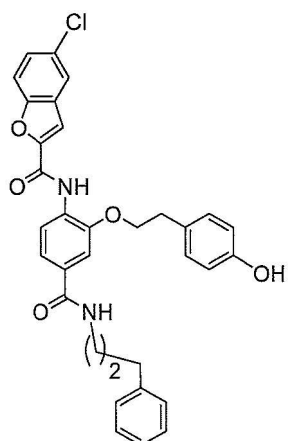
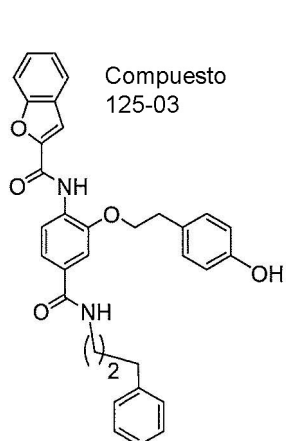
A continuación se muestran los compuestos particularmente preferidos de Fórmula II y Fórmula IV. A continuación se muestran los datos que ilustran la eficacia *in vitro* de estos compuestos junto con los datos de los compuestos contemplados adicionales.

25

30

35

40



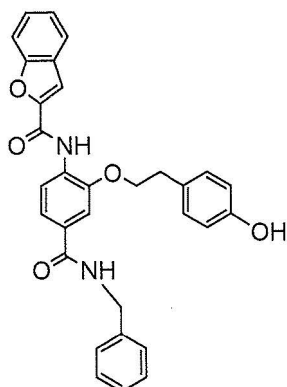
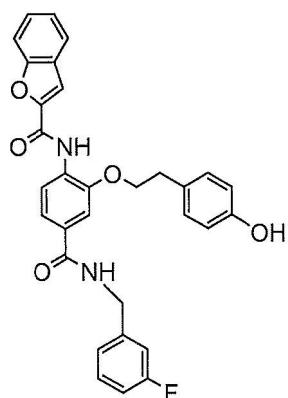
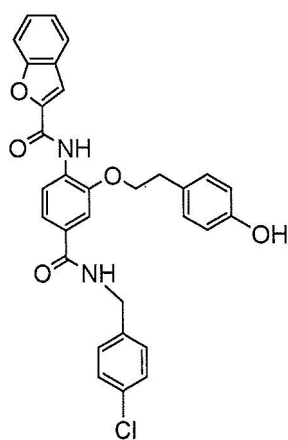
45

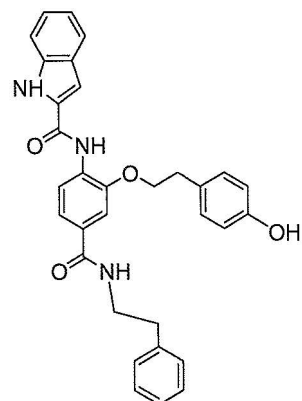
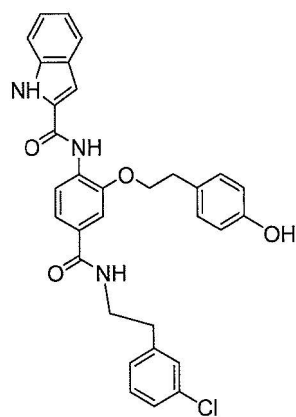
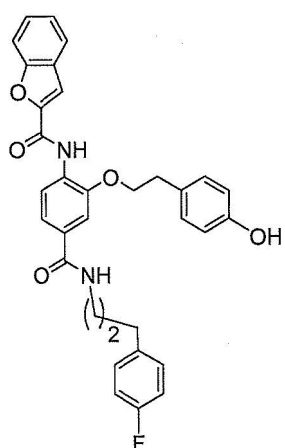
50

55

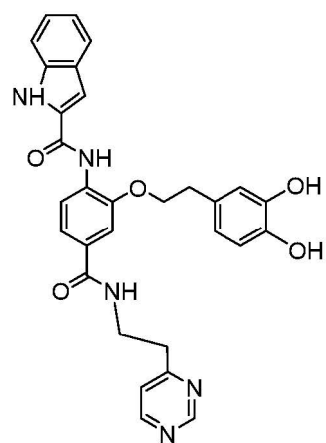
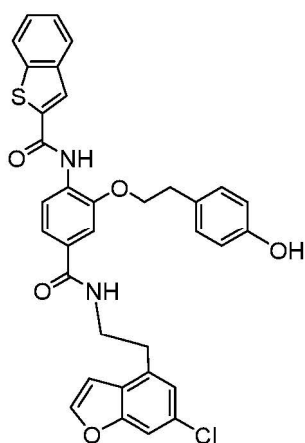
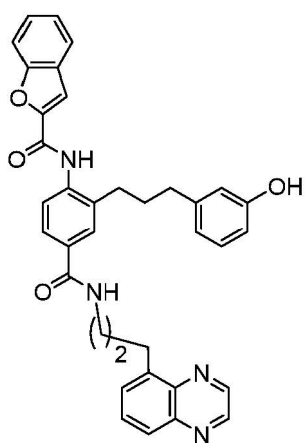
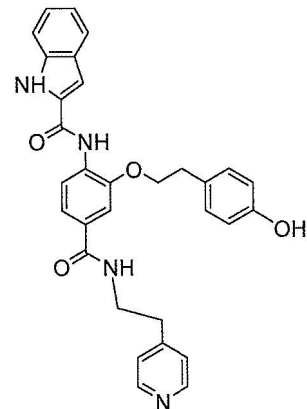
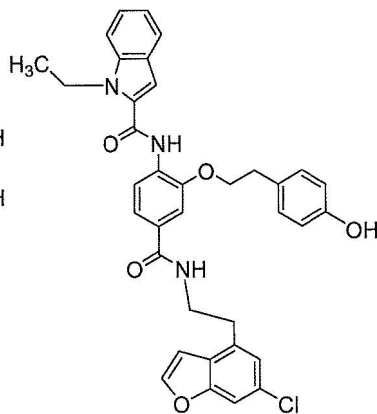
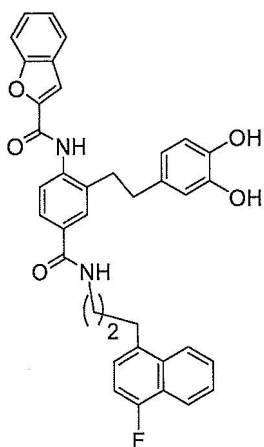
60

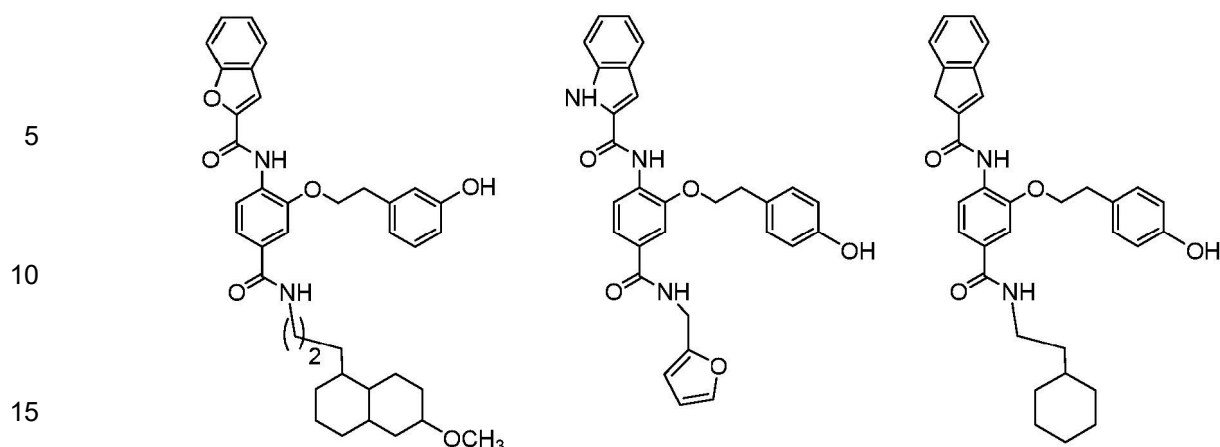
65





A continuación se ilustran otros compuestos ilustrativos de Fórmula I.





También se contempla una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz como adyuvante de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo disuelta o dispersa en un portador fisiológicamente aceptable.

También se contempla un compuesto de la invención o una sal de un compuesto farmacéuticamente aceptable de la invención para su uso en un método mejorado de vacunación. Aquí, las células de mamífero que necesitan vacunación se ponen en contacto con una composición inmunizante que comprende una cantidad inmunoeficaz de un inmunógeno y una cantidad adyuvante eficaz de un adyuvante. La mejora en este método comprende el uso de un compuesto o una sal de un compuesto farmacéuticamente aceptable de Fórmula I como adyuvante.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

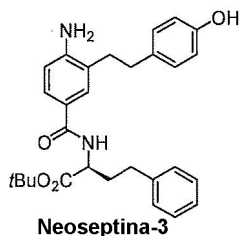
En los dibujos que forman parte de esta divulgación,

La Fig. 1 muestra una serie de gráficos de barras que ilustran un ensayo de producción normalizada de TNF- $\alpha$  en macrófagos de ratones que contienen mutaciones incapacitantes de la línea germinal o inactivaciones de genes que codifican los TLR y proteínas de señalización en sentido descendente que muestran que la producción de TNF- $\alpha$  estimulada por el Compuesto 125-03 es independiente del TLR incluyendo TLR4/MD-2.

La Fig. 2 es un gráfico que compara la actividad del Compuesto 125-03 y LPS e ilustra que el Compuesto 125-03 muestra actividad dependiente de la dosis en células humanas, estimulando la liberación de TNF- $\alpha$  de células THP-1 humanas diferenciadas.

La Fig. 3 muestra gráficos que ilustran los resultados de ELISA para el efecto adyuvante del Compuesto 125-03. En la Fig. 3, los adyuvantes se mezclaron con ovoalbúmina (OVA, 100  $\mu$ g) y se inyectaron por vía intramuscular en ratones C57BL/6J a las dosis indicadas. Se administraron dos inmunizaciones con un refuerzo a los 7 días. Se midieron los niveles en suero de IgG específica de OVA (ELISA) el día 35 después de la inmunización, e ilustran que el Compuesto 125-03 muestra una actividad adyuvante robusta y dependiente de la dosis.

La Fig. 4 proporciona una serie de gráficos que muestran los títulos de anti-ovoalbúmina a los 14 días después de la inmunización usando adyuvantes con ovoalbúmina (OVA, 100  $\mu$ g) e inyectados por vía intramuscular en ratones C57BL/6J. Los adyuvantes usados fueron el Compuesto 125-03, neoseptina-3 (abajo), LPS, MPLA (monofosforil lípido A de



*Salmonella minnesota* R595) y alumbre en las cantidades mostradas. n = 3.

La presente invención tiene varios beneficios y ventajas. Un beneficio es que el descubrimiento de adyuvantes molecularmente bien definidos y fáciles de manipular estructuralmente para reemplazar el adyuvante de Freund mal definido o alumbre (hidróxido de aluminio) y el LPS tóxico es un gran avance.

Una ventaja es que un adyuvante desarrollado puede ser útil en la prevención de la muerte prematura por

infecciones. Las moléculas pequeñas divulgadas son candidatos adyuvantes más prometedores que los ligandos naturales (LPS o lípido A), siendo más fáciles de producir y manipular estructuralmente, y son menos tóxicas, provocando respuestas mejoradas y cualitativamente diferentes que el LPS o lípido A, mientras actúan a través de la mediación de receptores diferentes de LPS o lípido A que utilizan uno o más receptores TLR como TLR4.

Otros beneficios y ventajas adicionales serán evidentes para el trabajador experto a partir de las descripciones que siguen.

## DEFINICIONES

En el contexto de la presente invención y las reivindicaciones asociadas, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

Los artículos "un" y "uno" se usan en la presente para referirse a uno o más de uno (es decir, por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

La palabra "antígeno" se ha usado históricamente para designar una entidad a la que se une un anticuerpo y también para designar la entidad que induce la producción del anticuerpo. El uso más actual limita el significado de antígeno a la entidad a la que se une un anticuerpo, mientras que la palabra "inmunógeno" se usa para la entidad que induce la producción de anticuerpos. En la presente se seguirá ese uso más actual.

Las palabras "orto", "meta" y "para" se usan en su forma habitual para describir compuestos bencenoides que se sustituyen por "1-2", "1-3" y "1-4", respectivamente. Esas mismas palabras también se usan en la presente por conveniencia para describir esos mismos patrones de sustitución en compuestos alifáticos.

La palabra "hidrocarbilo" se usa en la presente como un término abreviado para un grupo no aromático que incluye grupos alifáticos de cadena lineal y ramificada así como grupos alicíclicos o radicales que contienen solo carbono e hidrógeno. Por tanto, se contemplan los grupos alquilo, alqueno y alquino, mientras que a los hidrocarburos aromáticos como los grupos fenilo y naftilo, que estrictamente hablando también son grupos hidrocarbilo, se hace referencia en la presente como grupos o radicales arilo, como se analiza más adelante.

Cuando se pretende un grupo sustituyente hidrocarbilo alifático específico, se cita ese grupo; es decir, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, metilo o terc-butilo. Los grupos hidrocarbilo ejemplares contienen una cadena de 1 a 4 átomos de carbono, y preferiblemente 1 o 2 átomos de carbono.

Un grupo hidrocarbilo particularmente preferido es un grupo alquilo. Como consecuencia, puede enumerarse un sustituyente generalizado, pero más preferido, reemplazando el descriptor "hidrocarbilo" por "alquilo" en cualquiera de los grupos sustituyentes enumerados en la presente.

Los ejemplos de radicales alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo. Los ejemplos de radicales alqueno adecuados incluyen etenilo (vinilo), 2-propenilo, 3-propenilo, 1,4-butadienilo, 1-butenilo, 2-butenilo y 3-butenilo. Los ejemplos de radicales alquino incluyen etinilo, 2-propinilo, 1-propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 3-butinilo y 1-metil-2-propinilo.

Como entenderá un experto en la técnica, no se pretende que un sustituyente que no puede existir como un grupo alqueno C<sub>1</sub> esté abarcado por la palabra "hidrocarbilo", aunque sí se pretenden tales sustituyentes con dos o más átomos de carbono.

Cuando se usa la palabra "hidrocarbilo" se sigue la nomenclatura habitual de sufijos químicos, excepto que no siempre se sigue la práctica habitual de eliminar el "il" terminal y añadir un sufijo apropiado debido a la posible similitud de un nombre resultante con uno o más sustituyentes. Por lo tanto, un éter de hidrocarbilo se denomina grupo "hidrocarbiloxi" en lugar de grupo "hidrocarboxi", como posiblemente sea más apropiado cuando se siguen las reglas habituales de nomenclatura química. Los grupos hidrocarbiloxi ilustrativos incluyen grupos metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, aliloxi, n-butoxi, iso-butoxi, sec-butoxi y terc-butoxi.

El término "estructura de anillo" se usa en la presente para referirse a un sustituyente cíclico que puede contener un único anillo, como un grupo imidazolido o fenilo, o dos anillos fusionados como los que están presentes en un grupo naftilo, purinilo o decalinilo, o dos anillos enlazados como están presentes en un grupo bifenilo.

El término "ciclohidrocarbilo" o "carbocíclico", solo o en combinación, significa un radical hidrocarbilo cíclico (o anillo) que contiene de 5 a aproximadamente 12 átomos de carbono, preferiblemente de 5 a aproximadamente 10 átomos de carbono. Los ejemplos de tales radicales ciclohidrocarbilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, cicloheptinilo, 1- y 2-decalinilo y similares.

El término "arilo", solo o en combinación, significa un sistema de anillo aromático. Dicho sistema de anillo incluye un sistema de anillo de fenilo, naftilo y bifenilo.



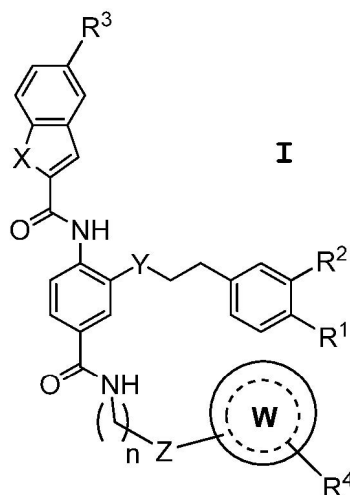
El heterociclilo (heterociclo) es un anillo único de 5 o 6 miembros o un sistema de anillo 5,5- 5,6-6,6 fusionados o enlazados que contiene de 1 a 4 heteroátomos (no carbonos) en el anillo que son independientemente átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre en un anillo saturado o parcialmente insaturado. Los ejemplos de tales grupos heterociclilo son los grupos pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, tiamorfolinilo, oxatiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, pirazolilo, 1,2,4-oxadiazinilo y azepinilo y un grupo bipiperidinilo.

Un grupo "heteroarilo" es un anillo heterocíclico aromático que contiene preferiblemente uno, dos, tres o cuatro átomos en el anillo distintos del carbono. Esos heteroátomos pueden ser independientemente nitrógeno, azufre u oxígeno. Un grupo heteroarilo puede contener un único anillo de 5 o 6 miembros o un sistema de anillo fusionados que tiene dos anillos de 6 miembros o un anillo de 5 y 6 miembros, o un anillo de 5,5-, 5,6- o 6,6- miembros enlazados como en un grupo bipiridinilo. Los grupos heteroarilo ejemplares adicionales incluyen sustituyentes de anillo de 6 miembros como piridilo, pirazilo, pirimidinilo y piridazinilo; sustituyentes del anillo de 5 miembros como grupos 1,3,5-, 1,2,4- o 1,2,3-triazinilo, imidazilo, furanilo, tiofenilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, 1,2,3-, 1,2,4-, 1,2,5- o 1,3,4-oxadiazolilo e isotiazolilo; sustituyentes de anillos fusionados de 6/5 miembros como grupos benzotiofuranilo, isobenzotiofuranilo, bencisoxazolilo, benzoxazolilo, purinilo y antranilo; y anillos fusionados de 6/6 miembros como grupos 1,2-, 1,4-, 2,3- y 2,1-benzopironilo, quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo, quinazolinilo y 1,4-benzoxazinilo.

Cada uno de los cuatro sistemas de anillos analizados anteriormente está abarcado por el sistema de anillo W. La frase "sistema de anillo aromáticos" se pretende que incluya grupos de anillos tanto arilo como heteroarilo. Cada uno de esos sistemas de anillos puede llevar opcionalmente uno o más grupos sustituyentes que contienen un total de hasta 8 átomos seleccionados del grupo que consiste en flúor, cloro, carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre, y mezclas de los mismos. Los hidrógenos no se cuentan en el número total de átomos presentes en el uno o más sustituyentes.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. La presente invención contempla un Compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz como adyuvante de dicho compuesto o su sal, y un método para usar un compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable. Más particularmente, un compuesto contemplado corresponde en estructura a la Fórmula I, a continuación.



en donde:

**X** es O, S, NR<sup>5</sup>, o CH<sub>2</sub>, donde R<sup>5</sup> es hidrido (H), o hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

**Y** es O, CH<sub>2</sub> o está ausente;

**Z** es O, S, NR<sup>6</sup>, o CH<sub>2</sub>, donde R<sup>6</sup> es hidrido (H), o hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

**n** es un número que es cero, 1 o 2, pero **n** solo es cero cuando **Z** es CH<sub>2</sub>;

**R**<sup>1</sup> es H u OH, **R**<sup>2</sup> es H u OH, o **R**<sup>1</sup> es OH y **R**<sup>2</sup> es OH, pero por lo menos uno de **R**<sup>1</sup> y **R**<sup>2</sup> es OH;

**R**<sup>3</sup> es hidrido (H), halógeno (F, Cl o Br), azido (N<sub>3</sub>), hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o trifluorometilo (CF<sub>3</sub>);

**R**<sup>4</sup> es hidrido, halógeno, azido, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o trifluorometilo;

**W** es una estructura de anillo, preferiblemente una estructura de anillo aromático, que contiene uno o dos anillos e incluye de 5 a 12 átomos en la estructura del anillo. Esa estructura de anillo **W** contiene opcionalmente a) 1, 2,

3 o 4 heteroátomos que son independientemente oxígeno, nitrógeno o azufre, y contiene b) de uno a tres grupos sustituyentes (a los que se hace referencia colectivamente como  $R^4$ ) que incluyen uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidrido (H), hidroxilo (OH), hidrocarbilo  $C_1-C_4$ , hidrocarbilo  $C_1-C_4$ , halógeno y trifluorometilo unidos a uno o más átomos del anillo. Los sustituyentes preferidos incluyen grupos azido, flúor, cloro, metilo, metoxi y trifluorometilo. Una línea de puntos (---) representa uno o más enlaces etilénicos ( $-C=C-$ ) presentes opcionalmente. Donde  $R^4$  es dos o tres sustituyentes, a esos sustituyentes se hace referencia individualmente como  $R^{4a}$ ,  $R^{4b}$  y  $R^{4c}$ , respectivamente, como están presentes.

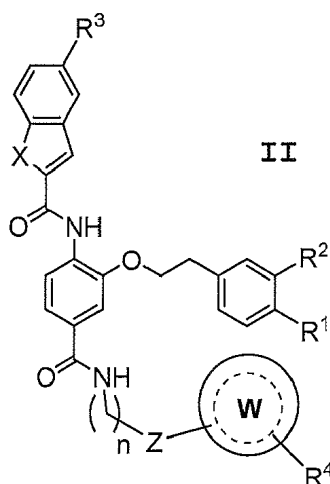
Un sistema de anillo **W** es preferiblemente aromático o heteroaromático (arilo o heteroarilo), en comparación con ciclohidrocarbilo o heterociclo, de manera que están presentes enlaces dobles opcionales. También se prefiere que estén presentes hasta cuatro heteroátomos y que esos heteroátomos sean cada uno nitrógeno. Se prefiere más que haya uno o dos átomos de nitrógeno en el sistema de anillo **W**.

En términos generales, los sistemas de anillos **W** ilustrativos incluyen grupos ciclopentenilo, ciclohexilo, cicloheptenilo, ciclooctilo, 1- y 2-decalinilo, fenilo, naftilo, bifenilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, tiamorfolinilo, oxatiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, pirazolilo, 1,2,4-oxadiazinilo, azepinilo, biperidinilo, piridilo, pirazilo, pirimidinilo, piridazinilo, 1,3,5-, 1,2,4- o 1,2,3-triazinilo, imidazilo, furanilo, tiofenilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, 1,2,3-, 1,2,4-, 1,2,5- o 1,3,4-oxadiazolilo, isotiazolilo, benzotiofuranilo, isobenzotiofuranilo, benzisoxazolilo, benzoxazolilo, purinilo, antraniloilo, 1,2-, 1,4-, 2,3- y 2,1-benzopironilo, quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo, quinazolinilo y 1,4-benzoxazinilo.

Un sistema de anillo **W** preferido es un único anillo aromático de 6 o 5 miembros. Dicho sistema de anillo preferido se ilustra mediante un grupo fenilo, piridilo, pirazilo, pirimidinilo, piridazinilo, imidazilo, furanilo, tiofenilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, 1,2,3-, 1,2,4-, 1,2,5-, o 1,3,4-oxadiazolilo y isotiazolilo. Los grupos fenilo, piridilo, pirazilo, pirimidinilo, imidazilo y furanilo son los más preferidos, siendo actualmente particularmente preferido el fenilo.

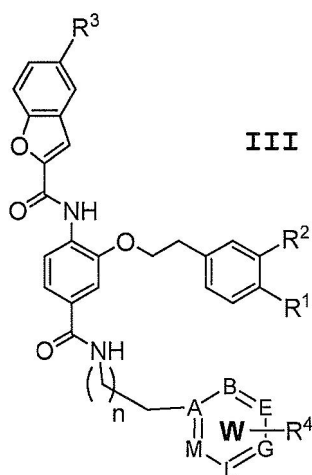
En preferencias separadas en cuanto a un compuesto de Fórmula I, a) **X** es O o  $NR^5$ ; y b) **Y** es O, y lo más preferible, tanto **X** como **Y** son O.

Un compuesto preferido de Fórmula I es un compuesto de Fórmula II, a continuación. En la Fórmula II, **W**, **Z**,



$n$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  son como se definen para la Fórmula I, y **X** es O o  $NR^5$ . Preferiblemente, en un compuesto de Fórmula II, la estructura de anillo **W** es una estructura de anillo aromático única de seis miembros (grupo arilo o heteroarilo), como un grupo fenilo, piridilo, pirimidinilo o pirazinilo, **X** es O y **Z** es  $CH_2$ .

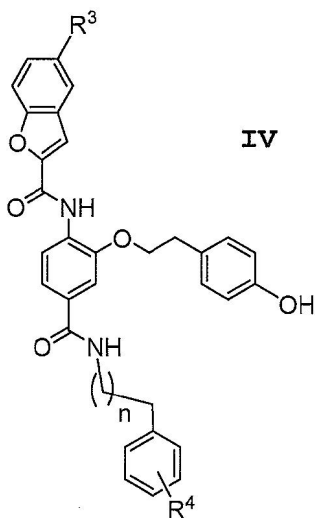
Un compuesto preferido de Fórmula II corresponde por tanto en estructura a la Fórmula III, a continuación, donde



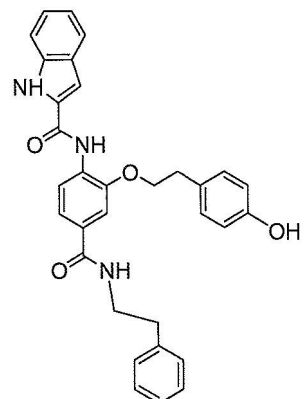
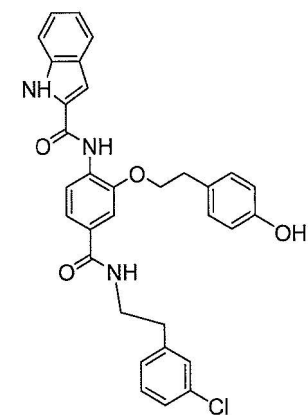
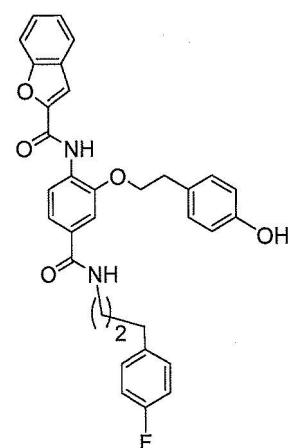
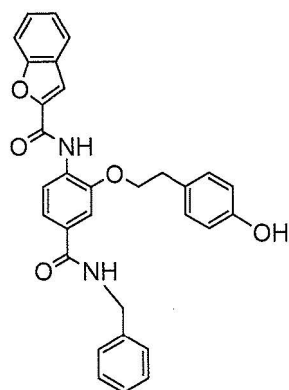
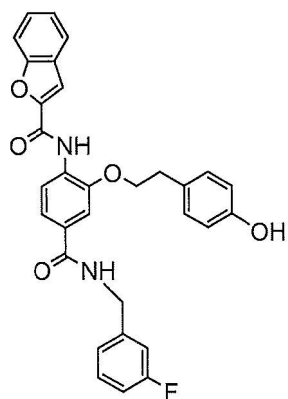
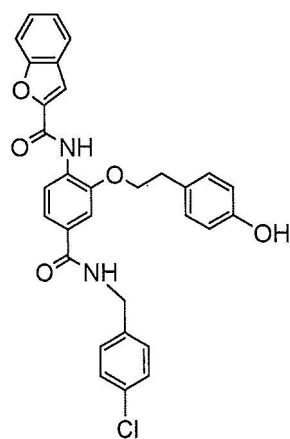
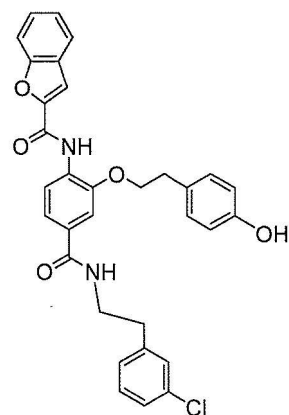
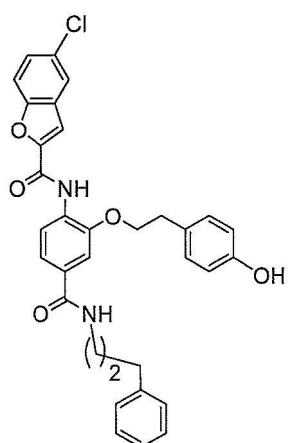
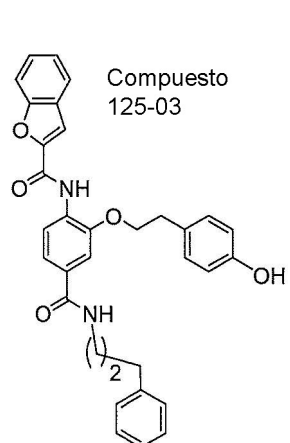
n, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son como se definen en la Fórmula I. **W** es una estructura de anillo aromático de seis miembros cuyos átomos de anillo: A, B, E, G, L y M son átomos de carbono (C) o de nitrógeno (N), con no más de dos de A, B, E, G, L y M siendo nitrógeno.

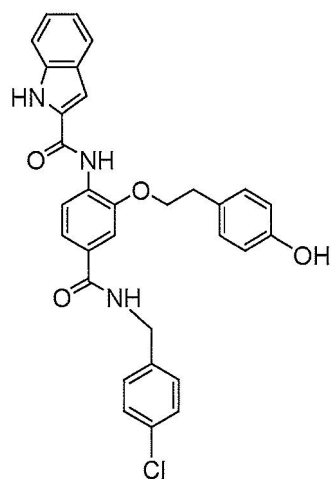
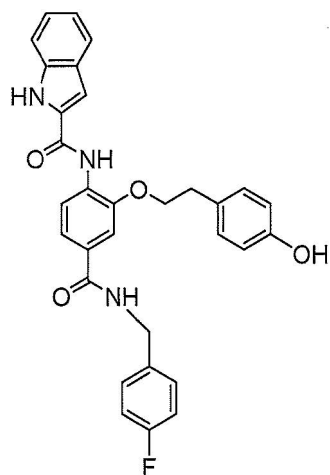
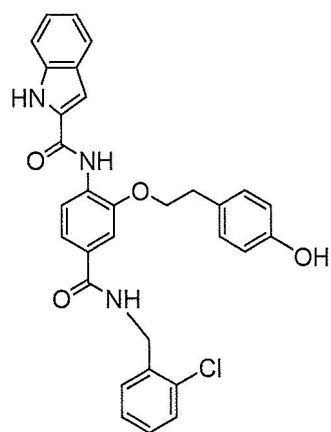
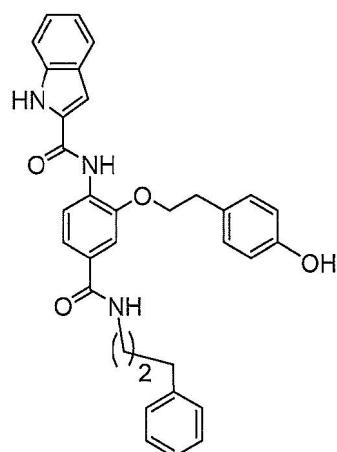
Preferiblemente, la estructura de anillo aromático de seis miembros **W** es un anillo de fenilo y R<sup>4</sup> es un solo sustituyente que es un halógeno *meta*- o para-sustituido, azido, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o un grupo trifluorometilo. En otra preferencia, R<sup>2</sup> es hidrido y R<sup>1</sup> es hidroxilo.

Un compuesto preferido de Fórmula III corresponde por tanto en estructura a la Fórmula IV, a continuación, donde n, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son como se han definido anteriormente.

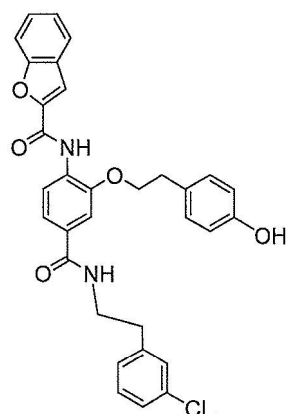
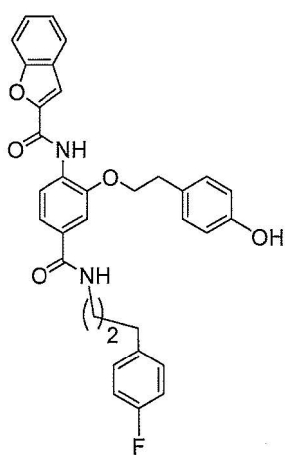
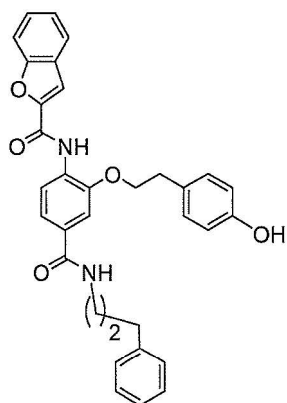


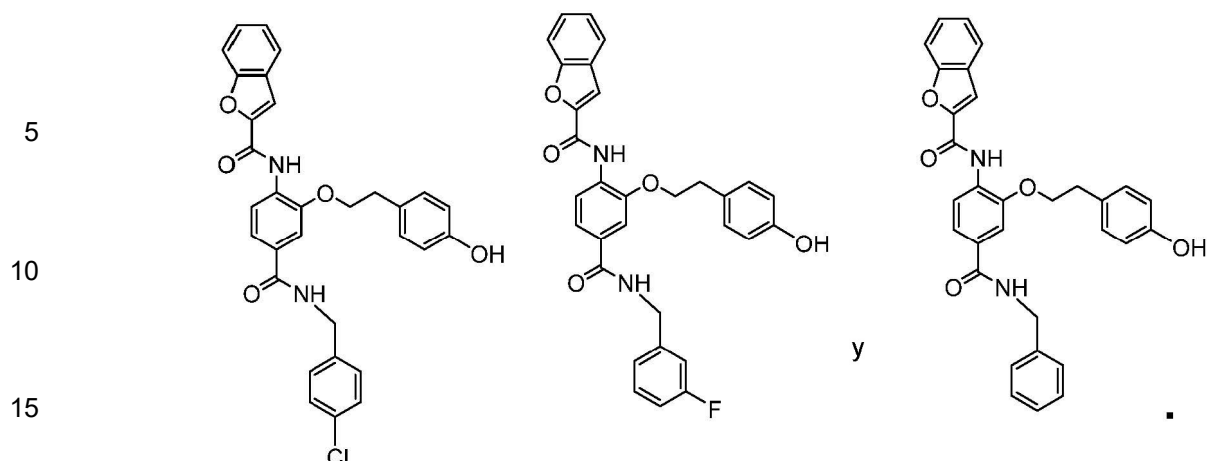
A continuación se muestran los compuestos particularmente preferidos de Fórmula II y Fórmula IV, donde R<sup>3</sup> es preferiblemente H (hidrido). Los datos que ilustran la eficacia *in vitro* de algunos de estos compuestos se muestran a continuación en la presente.





Un compuesto particularmente preferido del grupo anterior corresponde en estructura a una fórmula estructural mostrada a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.





### Composición Farmacéutica y Métodos

También puede usarse un Compuesto de Fórmula I contemplado en la fabricación de un medicamento (composición farmacéutica). Cuando se usa así, un compuesto contemplado de fórmula I está presente en una cantidad eficaz como adyuvante disuelta o dispersa en un diluyente (o portador) farmacéuticamente aceptable.

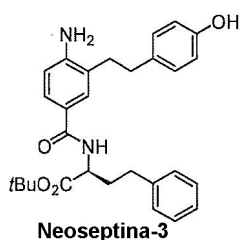
Un uso de tal composición es como adyuvante para una vacuna. Como tal, se contempla un compuesto de la invención o su sal farmacéuticamente aceptable para su uso en un método mejorado de vacunación en el que se administra a un mamífero que necesita vacunación una cantidad eficaz de un inmunógeno y una cantidad eficaz de un adyuvante. Aquí, la mejora comprende usar un Compuesto de Fórmula I o su sal farmacéuticamente aceptable como adyuvante.

Por ejemplo, los estudios ilustrados en otra parte de la presente muestran que el Compuesto ilustrativo 125-03 es un adyuvante sólido *in vivo* que provocó la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos de ratones C57BL/6 que contenían mutaciones incapacitantes de la línea germinal o inactivaciones de genes que codifican TLR y proteínas de señalización en sentido descendente (Fig. 1). Estos estudios ilustran que el Compuesto ilustrativo 125-03 induce la secreción de TNF- $\alpha$  de los macrófagos de una manera que es independiente de los TLR, incluyendo TLR4/MD2.

El compuesto ilustrativo 125-03 también indujo una respuesta inmunitaria de IgG sostenida en ratones C57BL/6 de tipo salvaje cuando se inyectó conjuntamente con ovoalbúmina como inmunógeno por vía intramuscular (I.M.) (Figs. 3y4). Se demostró que la respuesta inmunitaria es dependiente de la dosis (Fig. 3).

Además, a las dosis máximas capaces de administración, el Compuesto 125-03 no mostró la toxicidad evidente que es característica de la administración de LPS cuando se usa como adyuvante. Por tanto, un Compuesto de Fórmula I contemplado actúa para desencadenar una respuesta de las células inmunitarias (por ejemplo, leucocitos), imitando de este modo la acción de LPS, sin el resultado tóxico del uso de LPS como adyuvante.

Los estudios *in vitro* en células THP-1 humanas ilustraron una respuesta dependiente de la dosis a la cantidad de Compuesto 125-03 administrado a esas células (Fig. 2). La Neoceptina-3, un adyuvante de molécula pequeña modelo cuya fórmula estructural se muestra a continuación, requirió



aproximadamente el doble de la concentración para producir una respuesta de anticuerpos similar a los catorce días. Se ha demostrado que la neoceptina es un agonista de TLR4 y no es activa en las células humanas.

Una composición contemplada también contiene típicamente sales farmacéuticamente aceptables, tampones y excipientes similares a los que se hace referencia colectivamente como diluyentes o portadores farmacéuticamente (o fisiológicamente) aceptables en comparación con los que pueden estar presentes en una

composición que no está destinada para uso farmacéutico, como en un ensayo *in vitro*.

Un compuesto de la invención puede proporcionarse para su uso por sí mismo o como una sal farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un grupo hidroxilo fenólico R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> puede ser ácido y el ion de fenolato puede neutralizarse mediante un catión cargado positivamente.

Las sales útiles ejemplares para un compuesto contemplado incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: sulfato, clorhidrato, bromhidrato, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, ciclopentanopropionato, dodecilsulfato, etanosulfonato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenil-propionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, mesilato y undecanoato. Las sales del grupo fenilato incluyen sodio, potasio, magnesio, calcio, aluminio, amonio y muchas sales de amonio sustituido.

Se dirige al lector a Berge, J. Pharm. Sci. 1977 68(1):1-19 para listas de ácidos y bases farmacéuticamente aceptables usados comúnmente que forman sales farmacéuticamente aceptables con compuestos farmacéuticos.

En algunos casos, las sales también pueden usarse como ayuda en el aislamiento, purificación o resolución de los compuestos de esta invención. En tales usos, el ácido usado y la sal preparada no necesitan ser farmacéuticamente aceptables.

Como se ve a partir de los datos que siguen, un compuesto contemplado es activo en estudios de ensayo *in vivo* e *in vitro* en cantidades micromolares. Cuando se usa en un ensayo como un ensayo *in vitro*, un compuesto contemplado está presente en la composición en una cantidad que es suficiente para proporcionar una concentración de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 100 µM para contactar con las células que se van a ensayar.

Una composición farmacéutica contemplada contiene una cantidad eficaz de un Compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo disuelta o dispersada en un portador fisiológicamente (farmacéuticamente) aceptable. En algunas realizaciones, se utiliza una cantidad efectiva de adyuvante. Tal composición puede administrarse a células de mamíferos *in vitro* como en un cultivo celular para ponerla en contacto con esas células. Tal composición para su uso en un método de vacunación puede administrarse a células de mamífero, donde las células pueden ponerse en contacto *in vivo* como en un mamífero huésped vivo que lo necesite.

Cuando se usa como adyuvante de vacunas, un Compuesto de Fórmula I se administra preferiblemente junto con el inmunógeno seleccionado. Ambos componentes están preferiblemente presentes juntos en una única composición. Sin embargo, los dos ingredientes pueden estar presentes en composiciones administradas por separado, y esas composiciones separadas pueden administrarse con una diferencia de aproximadamente una a aproximadamente dos horas. Cuando se administran dos composiciones separadas, se prefiere que se administren lo más juntas posible en el tiempo.

Un Compuesto de Fórmula I está presente en una cantidad eficaz como adyuvante como se ha indicado anteriormente, mientras que el inmunógeno está presente en una cantidad eficaz como inmunógeno que puede variar con el inmunógeno y el animal huésped que se esté vacunando. Estas cantidades las determina fácilmente un experto en la técnica y se ilustran en la presente para un inmunógeno.

Se administró ilustrativamente *in vivo* un Compuesto de Fórmula I a ratones en un peso de adyuvante por kilogramo de sujeto animal de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mg/kg, y más habitualmente de aproximadamente 25 a aproximadamente 125 mg/kg. En la práctica habitual de los adyuvantes, se sabe que la cantidad de adyuvante no es necesariamente escalable con el peso corporal o el área de superficie del huésped animal al que se administra. Más bien, una cantidad de adyuvante usada en un animal pequeño también puede ser útil en un animal más grande.

Se cree que la dependencia de la dosis observada en la presente se curva hacia una asíntota. Un experto en la técnica puede obtener fácilmente una concentración adecuada para el uso de adyuvante *in vivo* comenzando con las cantidades mostradas como útiles en la presente. Las concentraciones útiles para ensayar la actividad *in vitro* son típicamente aquellas de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 µM, y más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 µM.

Una composición contemplada se administra típicamente *in vivo* a un sujeto con necesidad de ello una pluralidad de veces en el plazo de un mes, como diariamente o semanalmente, y puede administrarse durante un período de varios meses a varios años. Más habitualmente, una composición contemplada se administra una pluralidad de veces durante un curso de tratamiento.

Una composición farmacéutica contemplada puede administrarse por vía oral (por vía peroral) o por vía parenteral, lo que se prefiera, en una formulación que contiene portadores, adyuvantes y vehículos convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables, según se desee. El término parenteral como se usa en la presente incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular (que es la más preferida), intraesternal o técnicas de infusión. La formulación de fármacos se analiza, por ejemplo, en Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania; 1975 y Liberman, H.A. y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Nueva York, NY, 1980.

Una composición farmacéutica contemplada está preferiblemente adaptada para la administración parenteral. Por tanto, una composición farmacéutica está preferiblemente en forma líquida cuando se administra, y lo más preferible, el líquido es un líquido acuoso, aunque se contemplan otros líquidos como se analiza a continuación, y una composición actualmente más preferida es una preparación inyectable.

Por tanto, las preparaciones inyectables, por ejemplo, las soluciones o suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden emplearse están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio, solución salina tamponada con fosfato.

Otras composiciones farmacéuticas líquidas incluyen, por ejemplo, soluciones adecuadas para administración parenteral. Las soluciones en agua estéril de un Compuesto de Fórmula I o la solución estéril de un Compuesto de Fórmula I en solventes que comprenden agua, etanol o propilenglicol son ejemplos de composiciones líquidas adecuadas para la administración parenteral. En algunos aspectos, se proporciona un Compuesto de Fórmula I contemplado como un polvo seco que debe disolverse en un medio líquido apropiado como cloruro de sodio para inyección antes de su uso.

Además, se emplean convencionalmente como solvente o medio de suspensión aceites fijos estériles. Para este propósito, puede emplearse cualquier aceite fijo blando, incluyendo los monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de una composición inyectable. Pueden usarse dimetilacetamida, surfactantes que incluyen detergentes iónicos y no iónicos, polietilenglicoles. También son útiles las mezclas de solventes y agentes humectantes como los analizados anteriormente.

Las soluciones estériles pueden prepararse disolviendo el componente activo en el sistema solvente deseado y luego pasando la solución resultante a través de un filtro de membrana para esterilizarlo o, alternativamente, disolviendo el compuesto estéril en un solvente previamente esterilizado en condiciones estériles.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral pueden incluir cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. La cantidad de un Compuesto de Fórmula I contemplado en una forma de dosificación sólida es, como se ha analizado anteriormente, una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM, preferiblemente de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 50 nM, en el suero o plasma sanguíneo. Una forma de dosificación sólida también puede administrarse una pluralidad de veces durante un período de tiempo de una semana.

En tales formas de dosificación sólidas, un compuesto de esta invención normalmente se combina con uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración indicada. Si se administran *por vía oral*, los compuestos pueden mezclarse con lactosa, sacarosa, polvo de almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanóicos, ésteres de alquilo de celulosa, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, gelatina, goma arábiga, sodio alginato, polivinilpirrolidona y/o alcohol polivinílico, y luego formarse en comprimidos o encapsularse para una administración conveniente. Tales cápsulas o comprimidos pueden contener una formulación de liberación controlada que puede proporcionarse en una dispersión de compuesto activo en hidroxipropilmetilcelulosa. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes como citrato de sodio, carbonato o bicarbonato de magnesio o calcio. Los comprimidos y las píldoras también pueden prepararse con recubrimientos entéricos.

Un mamífero con necesidad de tratamiento (un sujeto o huésped) y al que se administra una composición farmacéutica que contiene un Compuesto de Fórmula I puede ser un primate como un humano, un simio como un chimpancé o un gorila, un mono como un mono cynomolgus o un macaco, un animal de laboratorio como una rata, un ratón o un conejo, un animal de compañía como un perro, un gato, un caballo o un animal de alimento como una vaca o un buey, una oveja, un cordero, un cerdo, una cabra, una llama o similares.

Cuando se contempla un ensayo *in vitro*, puede usarse una muestra para analizar, como células y tejido. Estas composiciones *in vitro* típicamente contienen agua, cloruro de sodio o potasio, y una o más sales tampón,



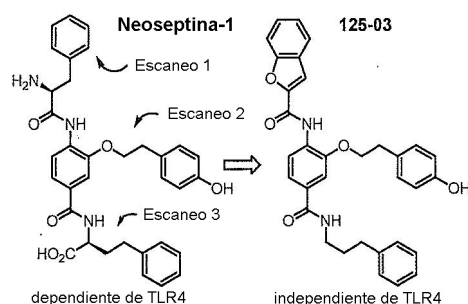
como sales de acetato y fosfato, Hepes o similares, un quelante de iones metálicos como EDTA que se tamponan a un valor de pH deseado, como pH 4,0-8,5, preferiblemente aproximadamente pH 7,2-7,4, dependiendo del ensayo a realizar, como es bien conocido.

Preferiblemente, la composición farmacéutica está en forma de dosificación unitaria. En tal forma, la composición se divide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del compuesto activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, el envase conteniendo cantidades discretas de la preparación, por ejemplo, en viales o ampollas.

En otra realización preferida, se administra un Compuesto de Fórmula I contemplado como adyuvante junto con uno o más materiales inmunogénicos como una vacuna. En la presente se ilustra una de tales composiciones en la que se usó ovoalbúmina como inmunógeno en la vacunación de ratones C57BL/6J.

## Resultados

En los esfuerzos para mejorar la actividad agonista de TLR4 de un líder de detección inicial, neoseptina-1 (abajo), que mide la liberación estimulada de TNF-alfa en macrófagos de ratón, se usó en la presente el Compuesto 125-03, como ilustrativo de los compuestos contemplados, surgió como un compuesto clave capaz de estimular la respuesta inmunitaria (abajo). Se descubrió que el compuesto 125-03 era activo estimulando la liberación de TNF-alfa tanto en macrófagos de ratón como en células THP-1 humanas diferenciadas a lo largo de la línea de macrófagos. Se descubrió que no solo era independiente de TLR4, sino también independiente de todos los demás TLR estudiados (TLR 2, 3, 4, 6, 7 y 9). [Los TLR 1, 2 y 6 se han perdido del genoma del ratón, y los TLR 11, 12 y 13 se han perdido del genoma humano. Beutler, Blood, 113:1399-1407 (2009).]

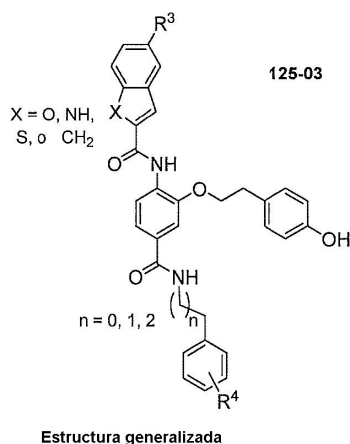


De líder de selección a un agonista independiente de TLR4 125-03

El compuesto 125-03 estimula la liberación de TNF-alfa tanto de los macrófagos de ratón como de las células THP-1 humanas diferenciadas y muestra una sólida actividad adyuvante. El compuesto 125-03 pertenece a una serie distinta de cualquier otro compuesto capaz de estimular la respuesta inmunitaria y la neoseptina-1 líder de selección original. Su SAR se ha explorado con unos 300 análogos explorando independientemente diferentes áreas de la molécula.

Estos estudios han demostrado que la liberación inducida de TNF-alfa en macrófagos de ratón o células THP-1 humanas diferenciadas requiere todos los elementos estructurales de la cadena lateral de Tyr central (por ejemplo, longitud del conector y OH de fenol, y la sustitución adicional de arilo disminuye o mitiga la actividad), y requiere la presencia y disposición espacial de cada cadena lateral de arilo terminal donde se tolera la sustitución en cada uno en la mayoría de los sitios. Los resultados representativos de los compuestos contemplados se ilustran en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1  
Producción de TNF- $\alpha$  tras el tratamiento compuesto (50  $\mu$ M) de células THP-1



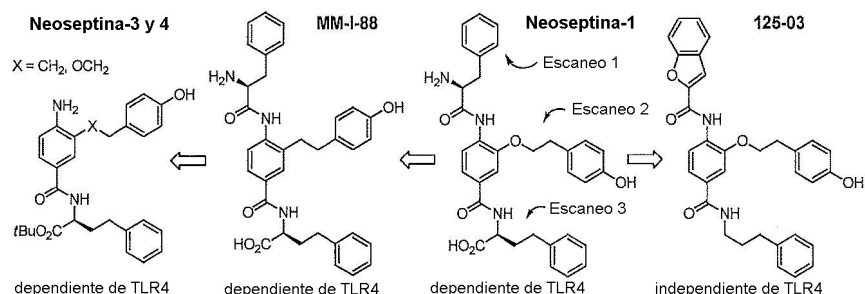
X	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	n	TNF-α
O	H	H	2	2000 pg/ml
O	Cl	H	2	1057 pg/ml
O	H	3-Cl	1	2477 pg/ml
O	H	4-Cl	0	2112 pg/ml
O	H	3-F	0	1924 pg/ml
O	H	4-F	2	1679 pg/ml
O	H	H	0	1679 pg/ml
NH	H	3-Cl	1	1077 pg/ml
NH	H	H	1	1185 pg/ml
NH	H	H	2	594 pg/ml
NH	H	2-Cl	0	855 pg/ml
NH	H	4-F	0	913 pg/ml
NH	H	4-Cl	0	795 pg/ml

La evaluación de los compuestos contemplados, como el 125-03, usando macrófagos de ratones que contienen mutaciones o inactivaciones de la línea germinal incapacitantes de cada uno de los genes que codifican los TLR o las moléculas de señalización en sentido descendente, reveló que la inducción de la liberación de TNF- $\alpha$  es independiente de todos los TLR, incluyendo el TLR4 y los correceptores MD-2, CD14 y CD36 (Fig. 1). Un compuesto contemplado requiere IRAK4, Sharpin e IKBKG y, tipo LPS, activa las vías de señalización de NF- $\kappa$ B, p38 MAPK y JNK en sentido descendente. Se preparó un reactivo de reticulación por fotoafinidad funcionalizado para experimentos desplegables de química de clic con biotina-N3 que sirve como antagonista de 125-03, pero no de LPS, lo que confirma que el Compuesto 125-03 actúa mediante un mecanismo distinto.

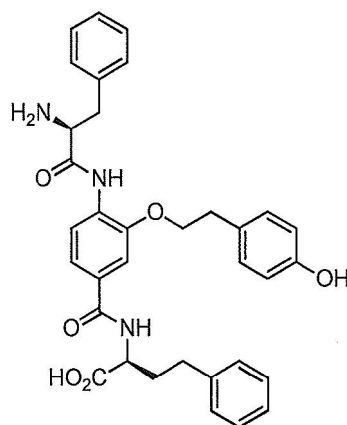
Estudios mecanicistas recientes han demostrado que un mutante de Tab2 (un receptor de cadena de ubiquitina K63) muestra una respuesta mejorada al Compuesto 125-03. Además, el silenciamiento de Cyld, una deubiquitinasa en la vía de señalización de TLR, muestra una respuesta mejorada al Compuesto 125-03. Además, los resultados del ensayo *in vitro* sugieren que el Compuesto 125-03 inhibe directamente la actividad de Cyld. Además, el Compuesto 125-03 también incrementó notablemente las respuestas a los ligandos de TLR, incluyendo la neoseptina-3. Estos resultados implican, pero no establecen completamente, que Cyld es el objetivo del Compuesto 125-03 y los otros compuestos de Fórmula I.

El compuesto ilustrativo 125-03 muestra una actividad robusta dependiente de la dosis para estimular la liberación de TNF-alfa (Fig. 2) y es activo y eficaz tanto en macrófagos de ratón como en células THP-1 humanas diferenciadas. Muestra una actividad adyuvante potente, dependiente de la dosis y eficaz *in vivo* (Fig. 3) y es más eficaz que el alumbre a las concentraciones usadas (Fig. 4).

El compuesto 125-03 es una molécula pequeña químicamente atractiva susceptible de amplia modificación química que activa la respuesta inmunitaria y muestra un SAR exquisitamente selectivo.

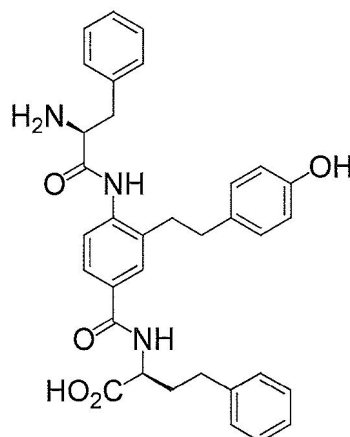


Se optimizó la actividad del líder de selección inicial, neoseptina-1, a continuación

**Neoseptina-1**

a través de la preparación de aproximadamente 850 compuestos, sondeando las dos partes finales de la estructura.

Tras explorar la región central de la neoseptina-1 (80 compuestos), se descubrió una mejora significativa en la eficacia del agonista de TLR4 con el Compuesto **MM-1-88**, a continuación, donde un único cambio de átomo en

**MM-I-88**

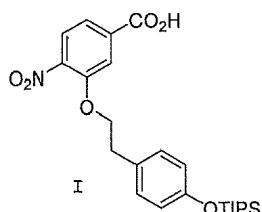
la neoseptina-1 (eliminación de un único átomo de oxígeno) proporcionó una eficacia aumentada. Casi todos los demás cambios en esta región de la molécula llevaron a una pérdida completa de actividad. La optimización adicional llevó a modificaciones estructurales simplificadoras adicionales y dos agonistas dependientes de TLR4 demostraron ser aún más eficaces (llamados neoseptina-3 y neoseptina-4), casi igualando la eficacia de LPS.

La producción inducida de TNF- $\alpha$  se estableció con el uso de macrófagos de ratones que tenían defectos genéticos en la línea germinal o inactivaciones de cada uno de los genes que codifican los TLR o sus moléculas de señalización en sentido descendente disponibles únicamente en los laboratorios del profesor Bruce Beutler (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX). Consultar, (a) [mutagenetix.utsouthwestern.edu](http://mutagenetix.utsouthwestern.edu); (b) Arnold et al., (2012) ENU-induced phenovariance in mice: Inferences from 587 mutations. BMC Res. Notes. 5, 577-0500-5-577.

#### Preparación de compuestos

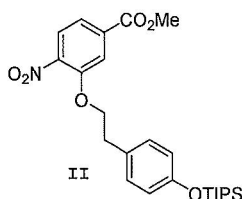
Un Compuesto de Fórmula I contemplado puede prepararse fácilmente usando procedimientos de química orgánica estándar. Las síntesis ilustrativas del Compuesto **125-03** se muestran como un modelo para las síntesis de otras moléculas descritas en la presente. Los compuestos cuya liberación de TNF-alfa inducida *in vitro* resulta de células THP-1 humanas se prepararon de manera análoga a la preparación del Compuesto **125-03** como se ilustra en el Esquema 1 a continuación en la presente.

Ácido 4-nitro-3-(4-(triisopropilsilo)-fenetoxi)-benzoico (I):



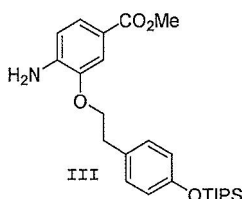
Se suspendió hidruro de sodio (500 mg, aproximadamente 2,4 equivalentes, suspensión al 60% en aceite mineral) en THE anhidro (25 ml) y se enfrió a 0° C. Se añadió gota a gota 2-(4-(Triisopropilsiloxi)fenil)etanol [ Shah et al., Org. Biomol. Chem. 2008, 6, 2168-2172 (1,50 g, 5,09 mmol) a la suspensión que se agitaba vigorosamente. Se retiró el baño frío y se agitó la mezcla durante 20 minutos. Después de enfriar a 0° C, se añadió lentamente ácido 3-fluoro-4-nitrobenzoico (915 mg, 4,85 mmol) como una solución en DMF anhidro (5 ml). El baño frío se retiró de nuevo y la mezcla se agitó durante 3,5 horas a temperatura ambiente. La reacción se inactivó con HCl 2 N (75 ml) y se diluyó con EtOAc (75 ml). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (50 ml) y la fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se decantó y se concentró al vacío. El producto se cristalizó en hexanos para dar 1,40 g (63%) de I como un sólido blanquecino. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.99 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.68 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.46 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.03 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.33 - 1.23 (m, 3H), 1.11 (d, *J* = 7.4 Hz, 18H).

4-nitro-3-(4-(triisopropilsiloxi)-fenetoxi)-benzoato de metilo (II):



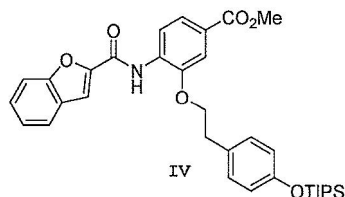
Se disolvió ácido carboxílico I (1,00 g, 2,18 mmol) en MeOH (10 ml). Se añadió gota a gota (trimetilsilil)-diazometano (1,63 ml, 1,50 equivalentes, solución 2 M en hexanos), con desprendimiento concomitante de gas N<sub>2</sub>. Después de 2 horas, se añadió lentamente AcOH (aproximadamente 0,5 ml, glacial) hasta que cesó el desprendimiento de gas. El solvente de la reacción se eliminó al vacío y el residuo se volvió a disolver en EtOAc (30 ml) y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado (25 ml). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró para dar 973 mg (94%) del éster metílico II, que se usó sin purificación adicional. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.83 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.47 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.11 (s, 3H), 3.25 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.48 - 1.35 (m, 3H), 1.26 (d, *J* = 7.3 Hz, 18H).

4-Amino-3-(4-(triisopropilsiloxi)-fenetoxi)-benzoato de metilo (III):



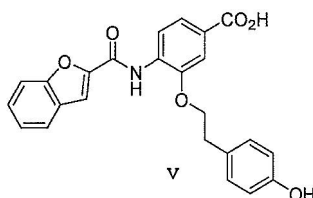
Se disolvió el éster metílico II (973 mg, 2,05 mmol) en acetona (25 ml). Se suspendió nanopulvo de zinc (2,02 g, 30,8 mmol, 15 equivalentes) en el solvente de reacción y la mezcla se enfrió a 0° C. Con agitación vigorosa, se añadió gota a gota NH<sub>4</sub>Cl saturado (6 ml). Después de 1 hora, la mezcla heterogénea se filtró a través de Celite® para eliminar las sales de Zn y el filtrado se diluyó con EtOAc (50 mL) y se lavó con H<sub>2</sub>O (50 IL). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se decantó y se concentró para dar 905 mg (99%) de anilina III. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.37 (dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.64 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.49 (s, 2H), 4.13 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.99 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.27 - 1.17 (m, 3H), 1.05 (d, *J* = 7.4 Hz, 18H).

4-(benzofuran-2-carboxamido)-3-(4-(triisopropilsiloxi)fenetoxi)benzoato de metilo (IV):



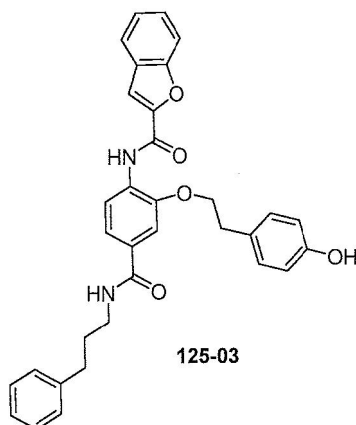
Se combinó ácido benzofuran-2-carboxílico (268 mg, 1,65 mmol) con anilina **III** (733 mg, 1,65 mmol) en DMF (8,0 ml) en un vial de centelleo de 20 ml. Se añadieron 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt; 250 mg, 1,82 mmol), EDCI•HCl (333 mg, 1,73 mmol) y 2,6-lutidina (0,965 ml, 8,26 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 48 horas, la mezcla de la reacción se vertió en HCl 0,1 N acuoso (50 ml). La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 ml). El extracto combinado se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (30 ml) y NaCl acuoso saturado (30 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó al vacío. La cromatografía ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 20% de EtOAc/hexanos) produjo 762 mg (78%) del producto acoplado **IV**. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.14 (s, 1H), 8.62 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.76 - 7.70 (m, 2H), 7.66 - 7.63 (m, 1H), 7.59 (dd, *J* = 2.8, 1.4 Hz, 2H), 7.50 (ddd, *J* = 8.4, 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.36 (ddd, *J* = 7.9, 7.2, 0.9 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.37 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.20 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.13 - 1.02 (m, 3H), 0.97 (d, *J* = 7.1 Hz, 18H).

Ácido 4-(benzofurano-2-carboxamido)-3-(4-hidroxifenetoxi)benzoico (**V**):



Se disolvió el éster metílico **IV** (762 mg, 1,30 mmol) en una mezcla de THF/MeOH/H<sub>2</sub>O (9 ml, 3 ml, 3 ml, respectivamente). Se añadió en porciones LiOH•H<sub>2</sub>O (544 mg, 13,0 mmol, 10 equiv) durante 10 minutos. Después de 4 horas, la mezcla de la reacción se concentró bajo una corriente de N<sub>2</sub> hasta 1/5 del volumen original y se añadió H<sub>2</sub>O (150 ml) para formar una solución lechosa. La solución se lavó una vez con Et<sub>2</sub>O (25 ml) y la capa etérea se separó y se descartó. La solución acuosa restante se acidificó con HCl 2 N hasta un pH de aproximadamente 2, después de lo cual comenzó a precipitar el ácido carboxílico de producto. El precipitado se volvió a disolver en EtOAc (100 ml) y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y concentraron para revelar 496 mg (92%) de ácido carboxílico **V**. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.29 (s, 1H), 9.13 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.32 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.66 - 7.55 (m, 3H), 7.43 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.60 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.34 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.07 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H).

*N*-(2-(4-hidroxifenetoxi)-4-((3-fenilpropil)-carbamoil)fenil)benzofuran-2-carboxamida (**125-03**):

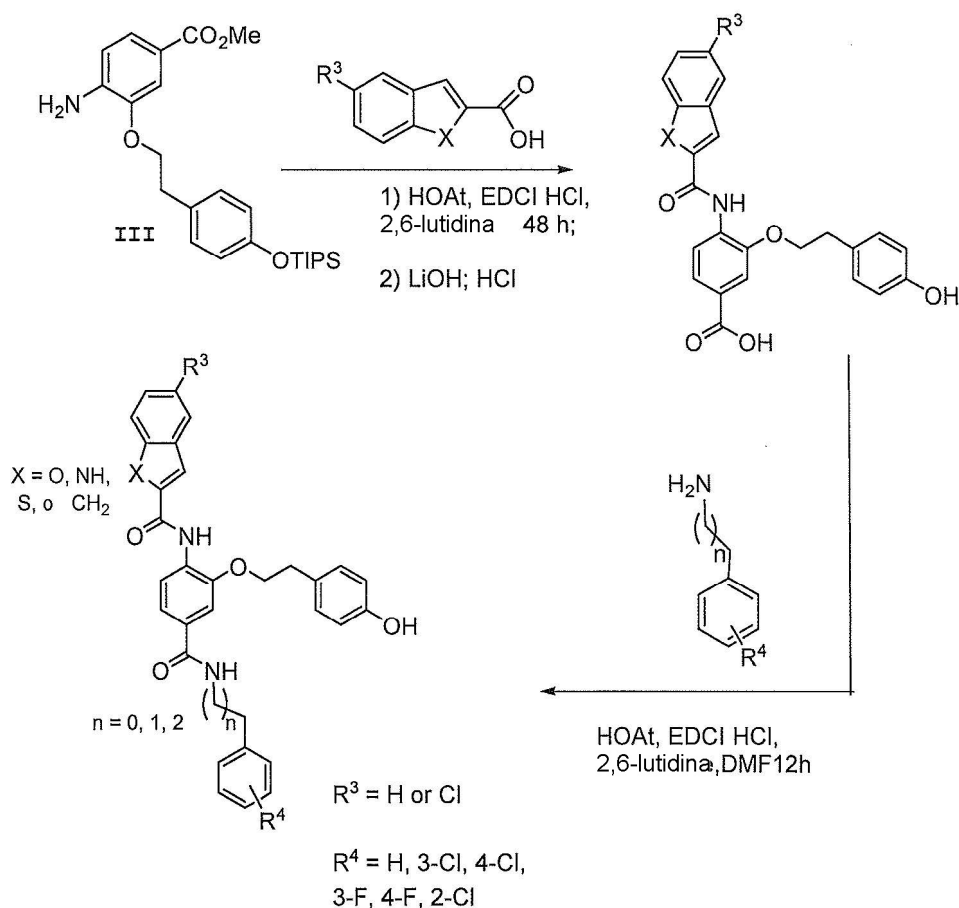


Se combinó el ácido carboxílico **V** (377 mg, 0,903 mmol) con 3-fenil-1-propilamina (122 mg, 0,903 mmol) en DMF (4,5 ml). Se añadieron HOAt (135 mg, 0,994 mmol), EDCI•HCl (182 mg, 0,948 mmol) y 2,6-lutidina (0,525 ml, 4,52 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 12 horas, la mezcla de la reacción se vertió en HCl

acuoso 1 N (20 ml). El producto precipitado en esta etapa se recuperó por filtración. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 40 ml). El extracto combinado se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (20 ml) y NaCl acuoso saturado, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío. El residuo resultante se volvió a disolver en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) con sonicación. A la solución turbia se añadieron gota a gota hexanos enfriados (1-2 ml) y el producto restante se aisló por filtración, para dar 376 mg (78%) de **125-03**. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.28 (s, 1H), 9.15 (s, 1H), 8.46 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.61 - 7.54 (m, 2H), 7.52 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.42 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.32 - 7.20 (m, 6H), 7.18 (m, 1H), 6.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.32 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.32 - 3.24 (m, 2H), 3.07 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.64 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.88 - 1.79 (m, 2H); IR (puro)  $\nu_{\max}$  3279, 1656, 1622, 1444, 1305, 1274 cm<sup>-1</sup>; LRMS (ESI-TOF) *m/z* 535.2 (calculado para C<sub>33</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> requiere 535.2); HRMS (ESI-TOF) *m/z* calculado para C<sub>33</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 535.2227, encontrado 535.2229.

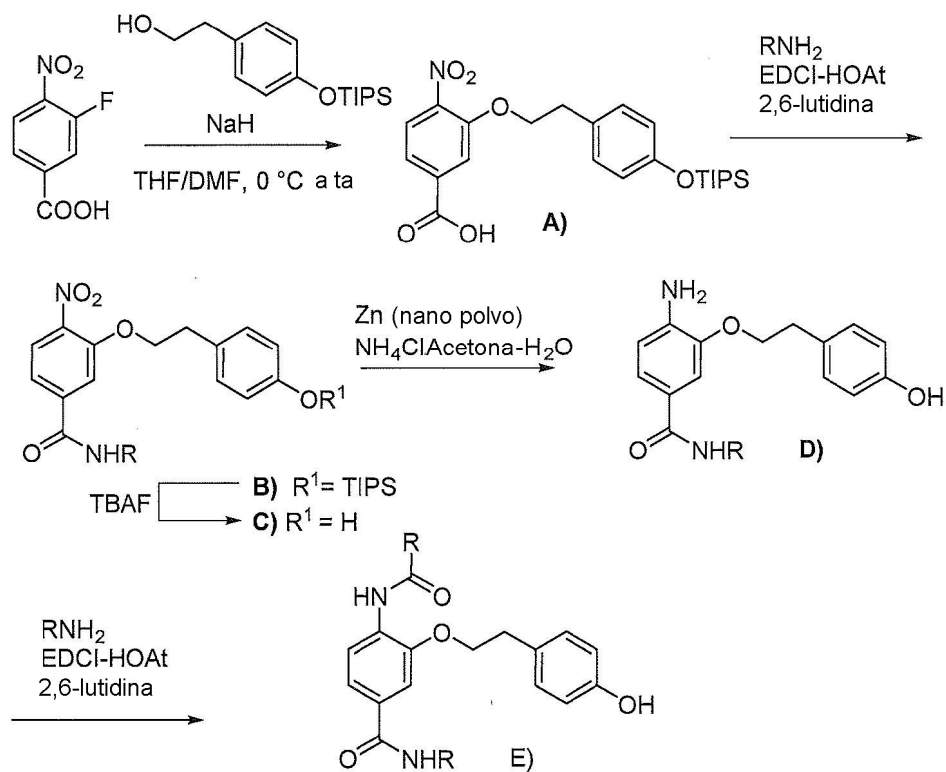
Los compuestos ejemplares utilizados en la Tabla 1 se prepararon de manera análoga a la utilizada para la preparación del Compuesto **125-03** analizado anteriormente que comenzó con el Compuesto **III**. Ese proceso sintético se muestra ilustrativamente en el Esquema 1, a continuación.

## Esquema 1



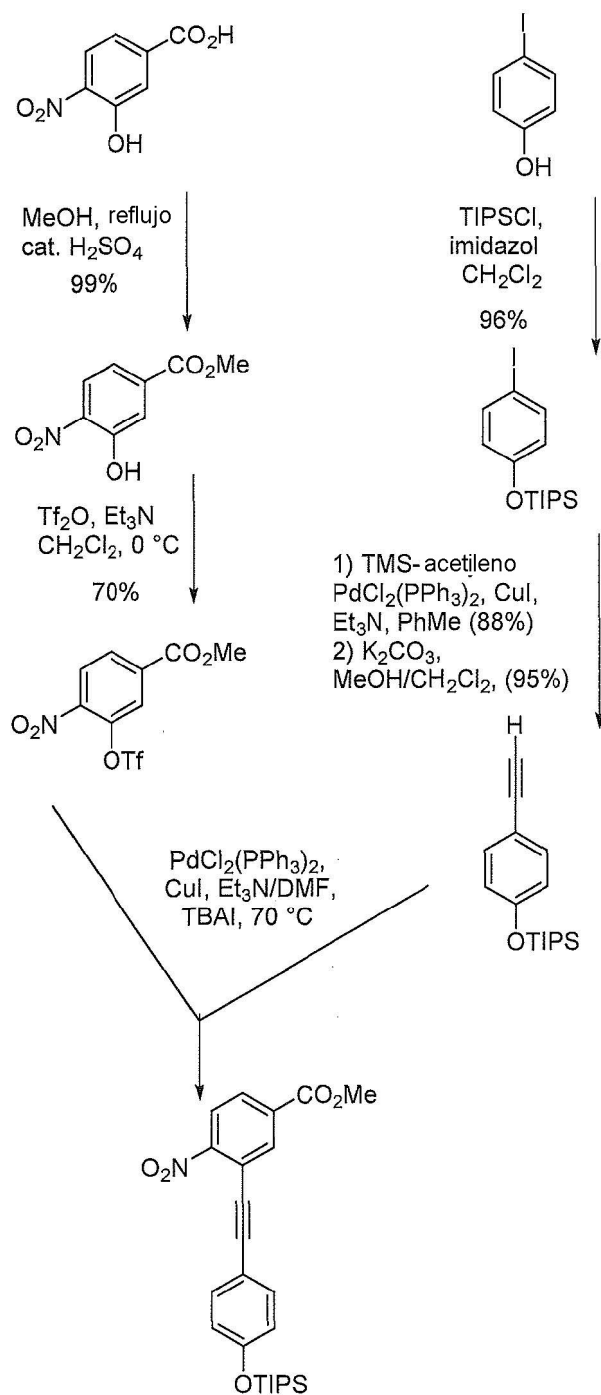
En el Esquema 2, a continuación, se expone una síntesis alternativa para estos compuestos.

## Esquema 2



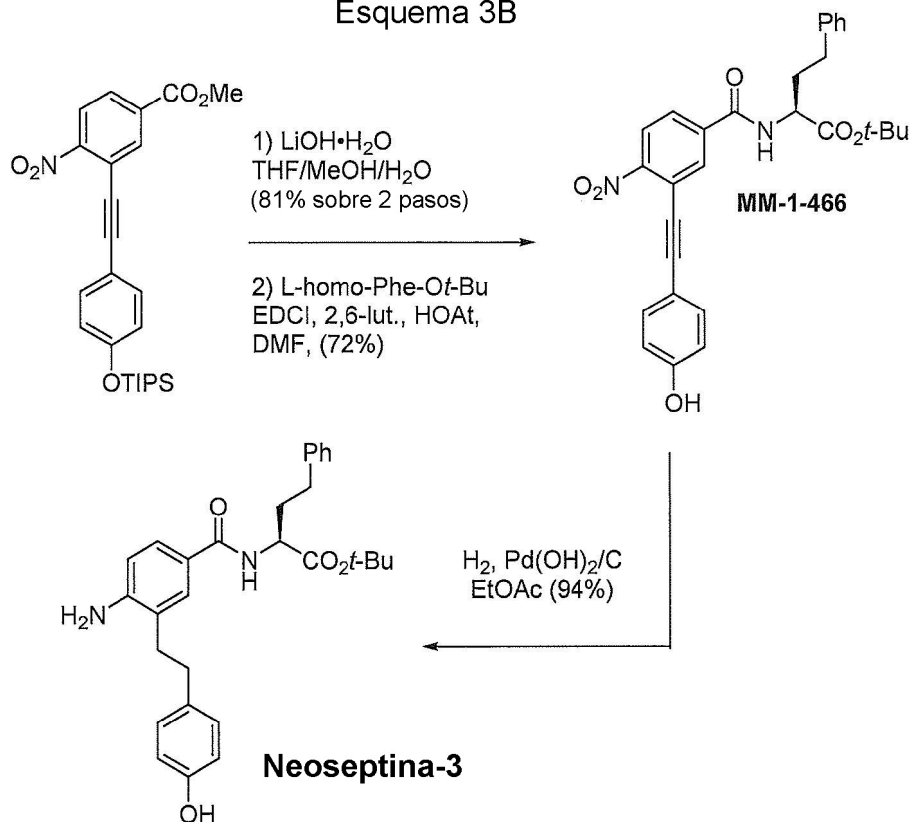
En los Esquemas 3A y 3B a continuación se ilustra esquemáticamente una síntesis ilustrativa de neoseptina-3.

## Esquema 3A

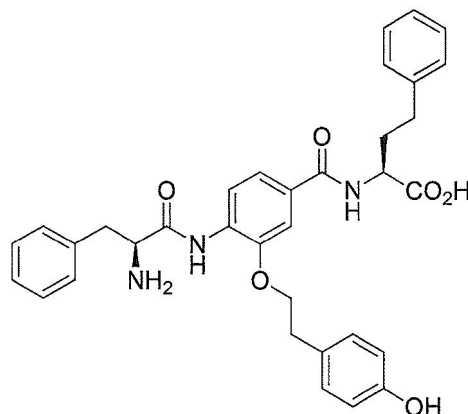




## Esquema 3B

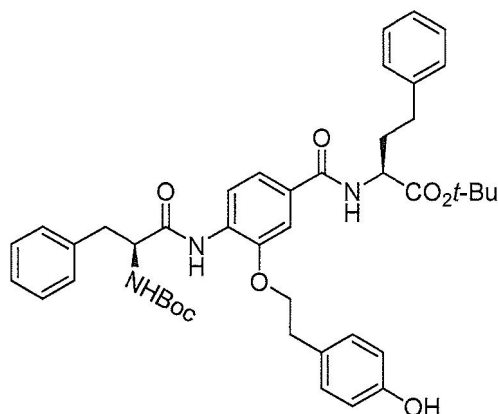


**Neoseptina-3** Se siguió el procedimiento general para la reducción de nitroaril alquino: se emplearon nitroalquino **MM-1-466** (530 mg, 1,06 mmol), EtOAc (10 ml), catalizador de Pearlman (250 mg). La cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , del 30 al 50% de EtOAc/hexanos) proporcionó 411 mg (82%) del producto completamente reducido, Neoseptina-3.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.44 (dd,  $J = 8.3, 2.2$  Hz, 1H), 7.34 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 7.32 - 7.28 (m, 2H), 7.25 - 7.16 (m, 3H), 6.99 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.78 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.63 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.49 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 4.82 - 4.76 (m, 1H), 2.90 - 2.61 (m, 6H), 2.28 (dddd,  $J = 13.7, 10.2, 6.3, 5.1$  Hz, 1H), 2.10 (m, 1H), 1.53 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.1, 167.2, 154.5, 147.8, 141.2, 133.0, 129.5, 129.1, 128.49, 128.48, 128.37, 126.3, 126.1, 125.2, 123.4, 115.6, 114.7, 82.5, 53.0, 34.5, 34.2, 33.4, 31.6, 28.1. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  475.2591, encontrado 475.2592.

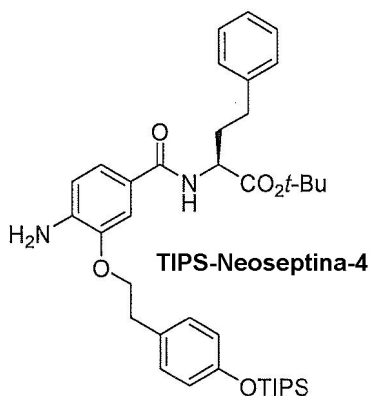
**Neoseptina-1**

El compuesto de boc-uretano **MM-1-315** (78 mg, 0,112 mmol) se disolvió en HCl 4 N/dioxano (1 ml, 4,00 mmol, aproximadamente 36 equiv.). La mezcla se agitó durante 6 horas, después de lo cual el solvente y el exceso de HCl se evaporaron bajo una corriente de  $\text{N}_2$  para revelar 65 mg (99%) de **Neoseptina-1** como la sal de HCl.

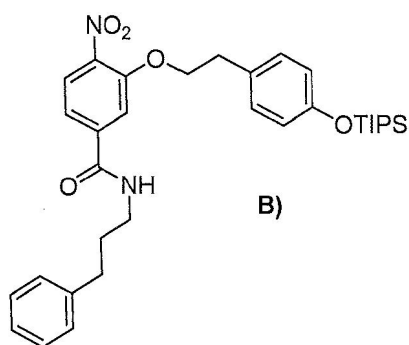
## MM-1-315



Se disolvieron **TIPS-Neoseptina-4** (200 mg, 0,309 mmol), BOAt (46 mg, 0,340 mmol, 1,1 equiv) y Boc-Phe-OH (82 mg,



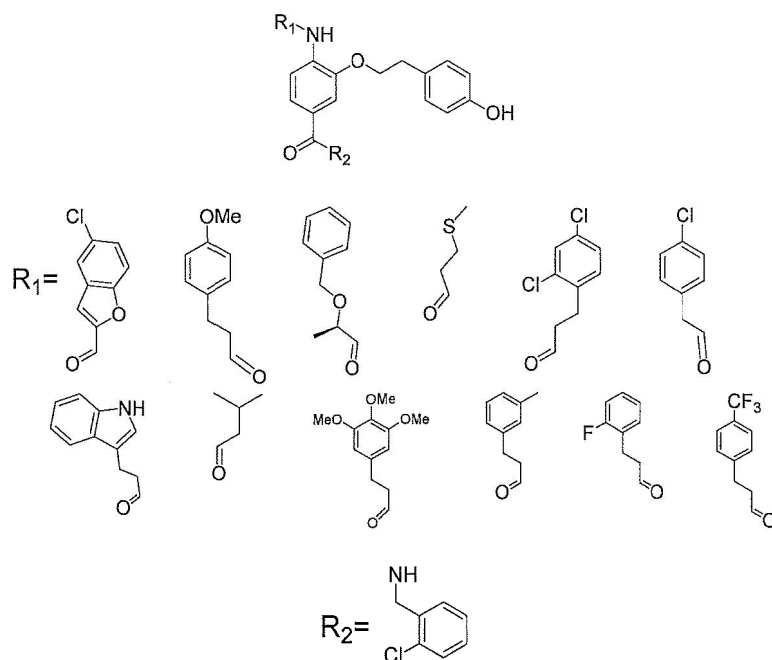
0,309 mmol, 1,0 equiv) en DMF anhidra (1,5 ml). Se añadió 2,6-lutidina (0,144 ml, 1,24 mmol, 4,0 equivalentes). Tras la disolución de los reactivos, se añadió EDCI•HCl (62 mg, 0,325 mmol, 1,05 equiv) y la mezcla se agitó durante 48 horas. Después de la dilución con EtOAc (10 ml), la mezcla se lavó con HCl 1 N (5 ml), NaHCO<sub>3</sub> saturado (5 ml) y salmuera (5 ml). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se decantó y se concentró. El residuo resultante se volvió a disolver en THE anhidro (2 ml) y se añadió gota a gota a temperatura ambiente fluoruro de tetra-*n*-butilamonio (TBAF) (1,0 ml, 3,0 equivalentes, 1 M en THF). Después de 30 minutos, se añadió H<sub>2</sub>O (10 ml) y la mezcla se diluyó con EtOAc (10 ml). La fase acuosa se extrajo una vez con EtOAc (10 ml) y las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se decantaron y concentraron. La cromatografía ultrarrápida (40% de EtOAc/hexanos) proporcionó 192 mg (89%) de la amida **MM-1-315**. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.45 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.40-7.20 (m, 11H), 7.10 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.65 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.55 (q, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.50-4.45 (m, 1H), 4.15 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.00 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.70-2.60 (m, 4H), 2.35-2.25 (m, 1H), 2.15-2.00 (m, 1H), 1.50 (s, 9H), 1.45 (s, 9H); MS-ESI (*m/z*) calculado para [C<sub>43</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>+H]<sup>+</sup> 737.3; encontrado: 738.3.



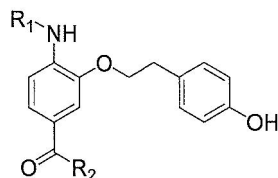
El Compuesto **B**) se preparó siguiendo los pasos establecidos en el Esquema 2. Por tanto, se utilizaron el Compuesto de ácido carboxílico **A**) (120 mg, 0,261 mmol), 3-fenilpropilamina (35 mg, 0,261 mmol, 1 equiv), 2,6-

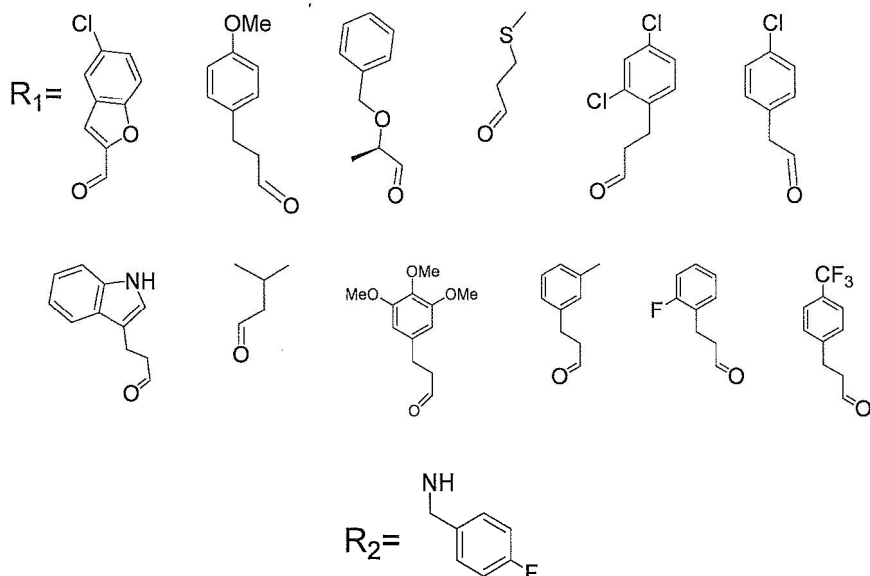
lutidina (0,084 ml, 0,783 mmol, 3 equivalentes), HOAt (43 mg, 0,313 mmol, 1,2 equivalentes) y EDCI•HCl (60 mg, 0,313 mmol, 1,2 equivalentes). La cromatografía ultrarrápida (20% de EtOAc/hexanos) proporcionó 119 mg (79%) del Compuesto **B**).

5 A continuación se muestran datos espectrales de masas ilustrativos para varios compuestos de Fórmula I y compuestos relacionados. En las representaciones a continuación, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son diferentes de los sustituyentes R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> de Fórmula I analizados anteriormente y R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> de las reivindicaciones.

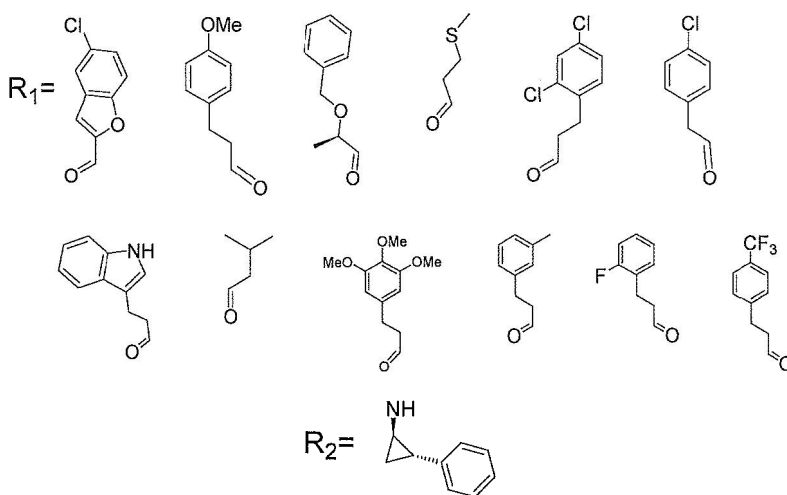
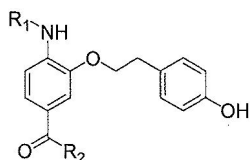


35 MS-ESI (m/z) calculado para [C<sub>31</sub>H<sub>24</sub>ClFN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + H]<sup>+</sup> 575.10; encontrado: 575.1; peso de la muestra (mg): 2.7  
 MS-ESI (m/z) calculado para [C<sub>32</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + H]<sup>+</sup> 559.2; encontrado: 559.2; peso de la muestra (mg): 2.85  
 MS-ESI (m/z) calculado para [C<sub>32</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + H]<sup>+</sup> 559.2; encontrado: 559.2; peso de la muestra (mg): 3.14  
 MS-ESI (m/z) calculado para [C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S + H]<sup>+</sup> 499.1; encontrado: 499.1; peso de la muestra (mg): 2.19  
 MS-ESI (m/z) calculado para [C<sub>31</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + H]<sup>+</sup> 597.1; encontrado: 597.1; peso de la muestra (mg): 1.76  
 MS-ESI (m/z) calculado para [C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + H]<sup>+</sup> 549.1; encontrado: 549.1; peso de la muestra (mg): 1.66  
 40 MS-ESI (m/z) calculado para [C<sub>33</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub> + H]<sup>+</sup> 568.2; encontrado: 568.2; peso de la muestra (mg): 1.96  
 MS-ESI (m/z) calculado para [C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + H]<sup>+</sup> 481.2; encontrado: 481.2; peso de la muestra (mg): 2.77  
 MS-ESI (m/z) calculado para [C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + H]<sup>+</sup> 619.2; encontrado: 619.2; peso de la muestra (mg): 2.34  
 MS-ESI (m/z) calculado para [C<sub>32</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + H]<sup>+</sup> 543.2; encontrado: 543.2; peso de la muestra (mg): 3.12  
 MS-ESI (m/z) calculado para [C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>ClFN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + H]<sup>+</sup> 547.2; encontrado: 547.2; peso de la muestra (mg): 3.72  
 45 MS-ESI (m/z) calculado para [C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>ClFN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + H]<sup>+</sup> 597.2; encontrado: 597.2; peso de la muestra (mg): 2.58

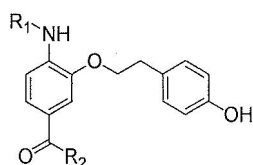


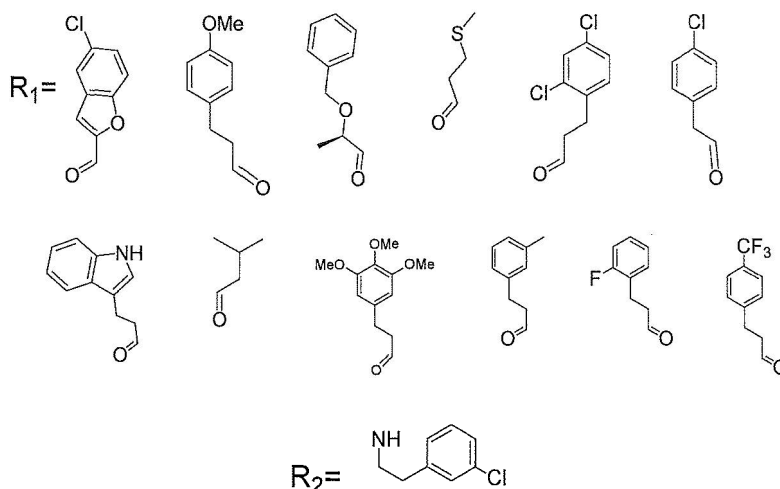


MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{29}F_3N_2O_6+H]^+$  + 595.2; encontrado: 595.2; peso de la muestra (mg): 1.14  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{26}H_{25}F_3N_2O_5S+H]^+$  + 535.1; encontrado: 534.1; peso de la muestra (mg): 2.79  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{31}H_{25}Cl_2F_3N_2O_5+H]^+$  + 633.1; encontrado: 633.1; peso de la muestra (mg): 1.83  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{30}H_{24}ClF_3N_2O_5+H]^+$  + 585.1; encontrado: 585.2; peso de la muestra (mg): 1.54  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{28}F_3N_3O_5+H]^+$  + 604.2; encontrado: 604.2; peso de la muestra (mg): 3.89  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{27}H_{27}F_3N_2O+H]^+$  + 517.2; encontrado: 517.2; peso de la muestra (mg): 1.87  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{33}F_3N_2O_8+H]^+$  + 655.2; encontrado: 655.2; peso de la muestra (mg): 2.11  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{29}F_3N_2O+H]^+$  + 579.2; encontrado: 579.2; peso de la muestra (mg): 2.93  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{31}H_{26}F_4N_2O_5+H]^+$  + 583.1; encontrado: 583.2; peso de la muestra (mg): 0.86  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{26}F_6N_2O_5+H]^+$  + 633.2; encontrado: 633.2; peso de la muestra (mg): 3.92

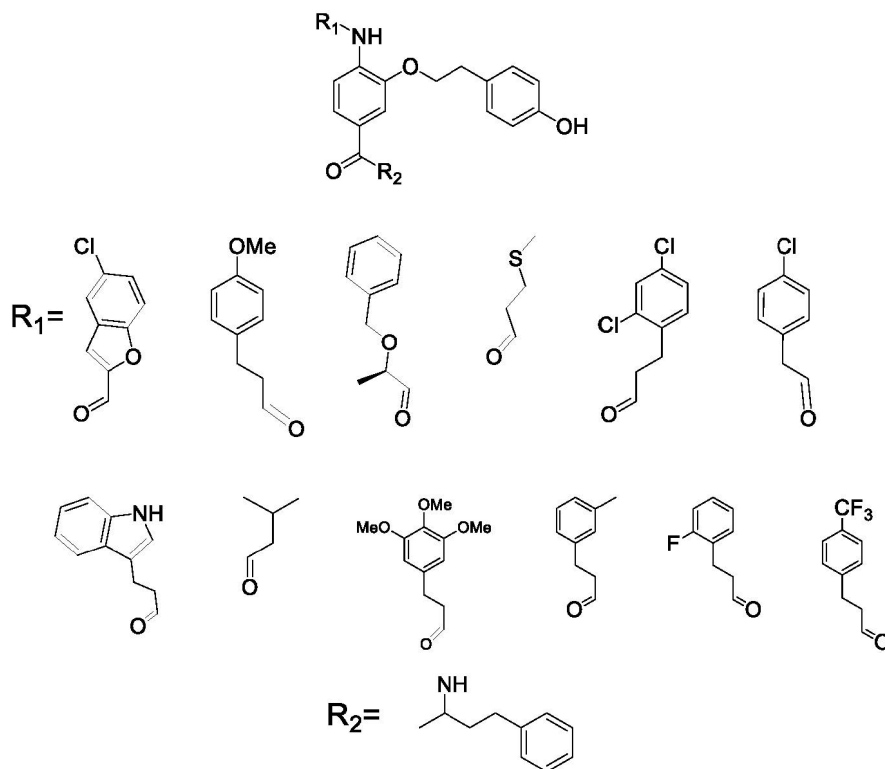


MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{27}ClN_2O_5+H]^+$  + 567.16; encontrado: 567.2; peso de la muestra (mg): 2.82  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{34}N_2O_5+H]^+$  + 551.2; encontrado: 551.2; peso de la muestra (mg): 2.24  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{34}N_2O_5+H]^+$  + 551.2; encontrado: 551.2; peso de la muestra (mg): 2.24  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{28}H_{30}N_2O_4S+H]^+$  + 491.2; encontrado: 491.2; peso de la muestra (mg): 1.80  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{30}Cl_2N_2O_4+H]^+$  + 589.15; encontrado: 589.2; peso de la muestra (mg): 1.79  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{29}ClN_2O_4+H]^+$  + 541.1; encontrado: 541.2; peso de la muestra (mg): 1.78  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{35}H_{33}N_3O_4+H]^+$  + 560.2; encontrado: 560.2; peso de la muestra (mg): 2.66  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{27}H_{27}F_3N_2O_5+H]^+$  + 473.2; encontrado: 473.2; peso de la muestra (mg): 1.45  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{36}H_{38}N_2O_7+H]^+$  + 611.2; encontrado: 611.2; peso de la muestra (mg): 2.16  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{34}N_2O_4+H]^+$  + 535.2; encontrado: 535.2; peso de la muestra (mg): 1.39  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{31}FN_2O_4+H]^+$  + 538.2; encontrado: 538.2; peso de la muestra (mg): 3.92  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{31}F_3N_2O_4+H]^+$  + 589.2; encontrado: 589.2; peso de la muestra (mg): 6.12

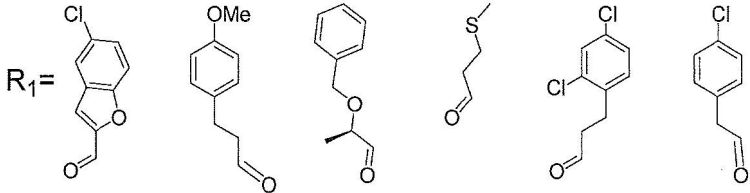


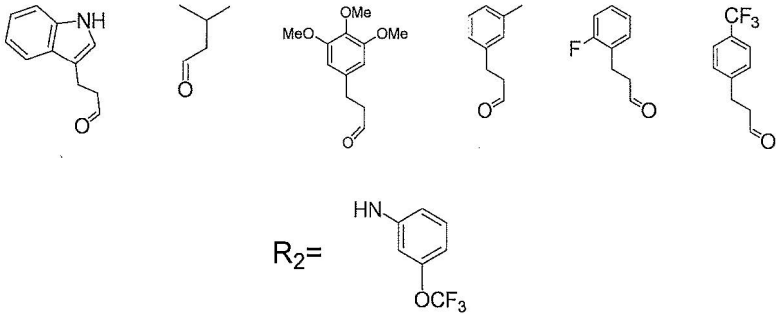


MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{26}Cl_2N_2O_5+H]^+$  589.2; encontrado: 589.2; peso de la muestra (mg): 3.14  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{33}ClN_2O_3+H]^+$  573.2; encontrado: 573.2; peso de la muestra (mg): 2.12  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{33}ClN_2O_5+H]^+$  573.2; encontrado: 573.2; peso de la muestra (mg): 2.23  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{27}H_{29}ClN_2O_4S+H]^+$  513.1; encontrado: 513.1; peso de la muestra (mg): 1.69  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{29}Cl_3N_2O_4+H]^+$  611.1; encontrado: 611.2; peso de la muestra (mg): 1.67  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{31}H_{28}Cl_2N_2O_4+H]^+$  563.1; encontrado: 563.2; peso de la muestra (mg): 2.84  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{32}ClN_3O_4+H]^+$  582.2; encontrado: 582.2; peso de la muestra (mg): 2.14  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{28}H_{31}ClN_2O_4+H]^+$  495.2; encontrado: 495.2; peso de la muestra (mg): 1.69  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{35}H_{37}ClN_2O_7+H]^+$  633.2; encontrado: 633.2; peso de la muestra (mg): 2.12  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{33}ClN_2O_4+H]^+$  557.2; encontrado: 557.2; peso de la muestra (mg): 2.18  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{30}ClFN_2O_4+H]^+$  561.2; encontrado: 561.2; peso de la muestra (mg): 2.6  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{30}ClF_3N_2O_4+H]^+$  611.2; encontrado: 611.2; peso de la muestra (mg): 5.37



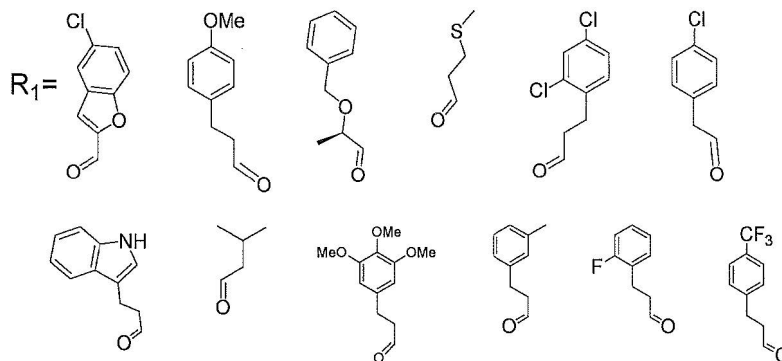
MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{31}ClN_2O_5+H]^+$  583.2; encontrado: 583.2; peso de la muestra (mg): 1.69  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{35}H_{38}N_2O_5+H]^+$  567.2; encontrado: 567.2; peso de la muestra (mg): 1.92  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{35}H_{38}N_2O_5+H]^+$  567.2; encontrado: 567.2; peso de la muestra (mg): 1.79

$R_1 =$ 


$R_2 =$ 


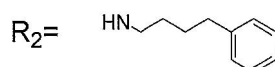
R1Nc1ccc(cc1OCc2ccc(O)cc2)C(=O)R2

5



10

15



20

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{31}ClN_2O_5+H]^+$  583.2; encontrado: 583.2; peso de la muestra (mg): 4.06

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{35}H_{38}N_2O_5+H]^+$  567.2; encontrado: 567.2; peso de la muestra (mg): 3.09

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{35}H_{38}N_2O_5+H]^+$  567.2; encontrado: 567.2; peso de la muestra (mg): 2.99

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{29}H_{34}N_2O_4S+H]^+$  507.2; encontrado: 507.2; peso de la muestra (mg): 1.29

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{34}Cl_2N_2O_4+H]^+$  605.2; encontrado: 605.2; peso de la muestra (mg): 2.23

25

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{33}ClN_2O_4+H]^+$  557.2; encontrado: 557.2; peso de la muestra (mg): 2.68

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{36}H_{37}N_3O_4+H]^+$  576.2; encontrado: 576.2; peso de la muestra (mg): 1.98

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{30}H_{36}N_2O_4+H]^+$  489.2; encontrado: 489.2; peso de la muestra (mg): 2.14

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{37}H_{42}N_2O_7+H]^+$  627.2; encontrado: 627.2; peso de la muestra (mg): 2.17

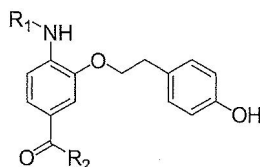
MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{35}H_{38}N_2O_4+H]^+$  551.2; encontrado: 551.2; peso de la muestra (mg): 3.13

30

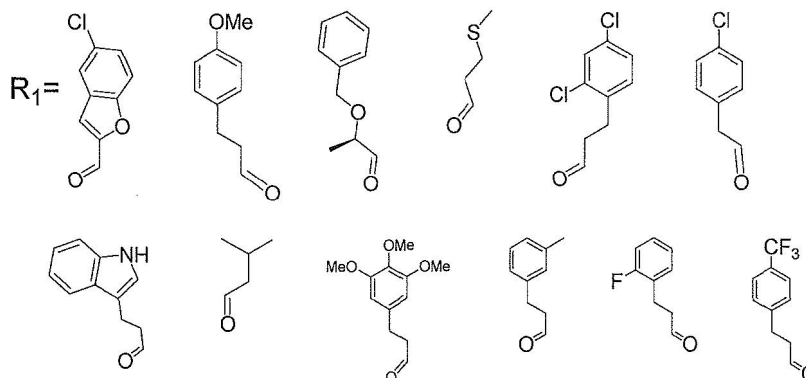
MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{35}FN_2O_4+H]^+$  555.2; encontrado: 555.2; peso de la muestra (mg): 1.89

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{35}H_{35}F_3N_2O_4+H]^+$  605.2; encontrado: 605.2; peso de la muestra (mg): 2.89

35



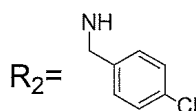
40



45

50

55



60

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{31}H_{24}ClFN_2O_5+H]^+$  575.10; encontrado: 575.1; peso de la muestra (mg): 1.76

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{31}ClN_2O_5+H]^+$  559.2; encontrado: 559.2; peso de la muestra (mg): 3.85

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{31}ClN_2O_5+H]^+$  559.2; encontrado: 559.2; peso de la muestra (mg): 1.89

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{26}H_{27}ClN_2O_4S+H]^+$  499.1; encontrado: 499.1; peso de la muestra (mg): 1.95

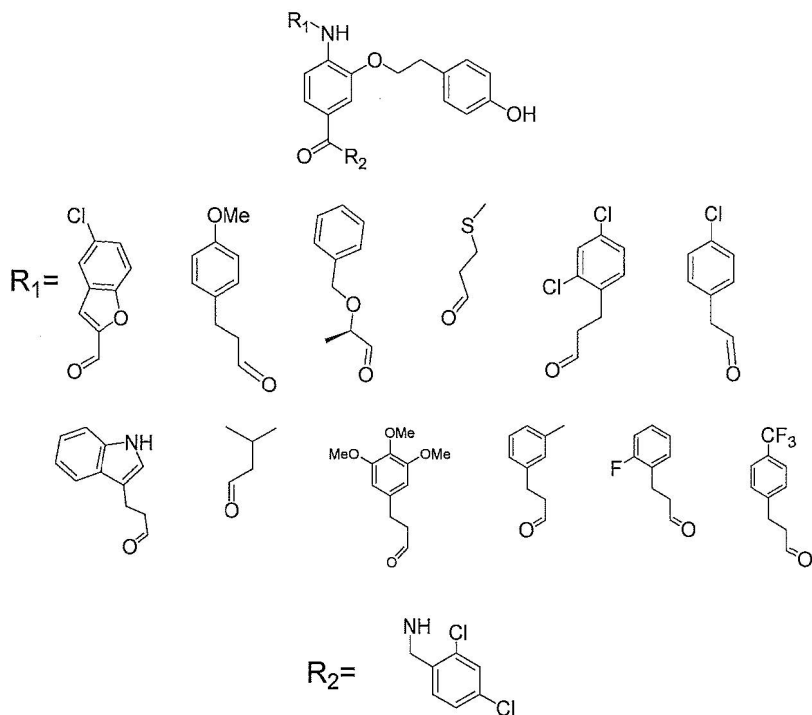
MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{31}H_{27}Cl_3N_2O_4+H]^+$  597.1; encontrado: 597.1; peso de la muestra (mg): 1.88

65

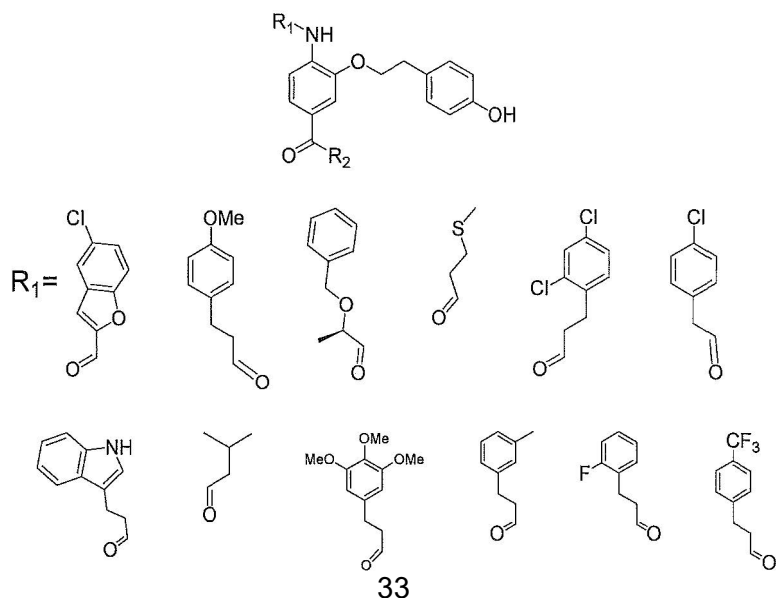
MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{30}H_{26}Cl_2N_2O_4+H]^+$  549.1; encontrado: 549.1; peso de la muestra (mg): 1.74



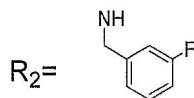
MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{30}ClN_3O_4 + H]^+$  568.2; encontrado: 568.2; peso de la muestra (mg): 2.17  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{27}H_{29}ClN_2O_4 + H]^+$  481.2; encontrado: 481.2; peso de la muestra (mg): 2.83  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{35}ClN_2O_7 + H]^+$  619.2; encontrado: 619.2; peso de la muestra (mg): 2.18  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{31}ClN_2O_4 + H]^+$  543.2; encontrado: 543.2; peso de la muestra (mg): 3.34  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{31}H_{28}ClFN_2O_4 + H]^+$  547.2; encontrado: 547.2; peso de la muestra (mg): 2.44  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{31}H_{28}ClFN_2O_4 + H]^+$  597.2; encontrado: 597.2; peso de la muestra (mg): 5.26



MS-ESI (m/z) calculado para  $[O_{31}H_{23}Cl_3N_2O_5 + H]^+$  609.2; encontrado: 609.2; peso de la muestra (mg): 3.91  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{30}Cl_2N_2O_5 + H]^+$  593.1; encontrado: 593.1; peso de la muestra (mg): 2.58  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{30}Cl_2N_2O_5 + H]^+$  593.2; encontrado: 593.2; peso de la muestra (mg): 1.68  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{26}H_{26}Cl_2N_2O_4S + H]^+$  533.2; encontrado: 533.2; peso de la muestra (mg): 2.18  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{31}H_{26}Cl_4N_2O_4 + H]^+$  631.2; encontrado: 631.2; peso de la muestra (mg): 1.67  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{30}H_{25}Cl_3N_2O_4 + H]^+$  583.1; encontrado: 583.2; peso de la muestra (mg): 3.13  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{29}Cl_2N_3O_4 + H]^+$  602.2; encontrado: 602.2; peso de la muestra (mg): 1.78  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{27}H_{28}Cl_2N_2O_4 + H]^+$  515.2; encontrado: 515.2; peso de la muestra (mg): 2.09  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{34}Cl_2N_2O_7 + H]^+$  653.2; encontrado: 653.2; peso de la muestra (mg): 3.13  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{30}Cl_2N_2O_4 + H]^+$  577.2; encontrado: 577.2; peso de la muestra (mg): 3.12  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{31}H_{27}Cl_2FN_2O_4 + H]^+$  581.2; encontrado: 581.2; peso de la muestra (mg): 5.26  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{27}Cl_2F_3N_2O_4 + H]^+$  631.2; encontrado: 631.2; peso de la muestra (mg): 5.1



5

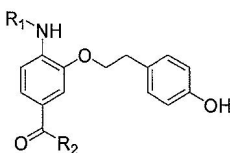


10

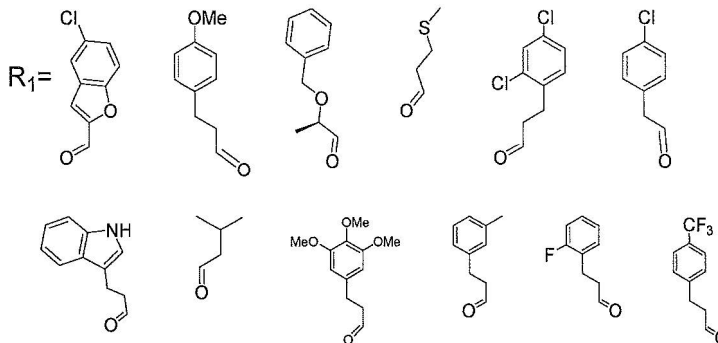
MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{31}\text{H}_{24}\text{ClFN}_2\text{O}+\text{H}]^+$  559.13; encontrado: 559.2; peso de la muestra (mg): 3.02  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{FN}_2\text{O}_5+\text{H}]^+$  543.3; encontrado: 543.3; peso de la muestra (mg): 1.79  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{FN}_2\text{O}_5+\text{H}]^+$  543.3; encontrado: 543.3; peso de la muestra (mg): 3.09  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{FN}_2\text{O}_4\text{S}+\text{H}]^+$  483.1; encontrado: 483.1; peso de la muestra (mg): 2.35  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{31}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}_4+\text{H}]^+$  581.2; encontrado: 581.2; peso de la muestra (mg): 3.31  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{ClFN}_2\text{O}_4+\text{H}]^+$  533.2; encontrado: 533.2; peso de la muestra (mg): 1.54  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{FN}_3\text{O}_4+\text{H}]^+$  552.2; encontrado: 552.2; peso de la muestra (mg): 1.79  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{FN}_2\text{O}_4+\text{H}]^+$  465.2; encontrado: 465.2; peso de la muestra (mg): 2.13  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{34}\text{H}_{35}\text{FN}_2\text{O}_7+\text{H}]^+$  603.2; encontrado: 603.2; peso de la muestra (mg): 3.07  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{FN}_2\text{O}_4+\text{H}]^+$  527.2; encontrado: 527.2; peso de la muestra (mg): 3.15  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_4+\text{H}]^+$  531.2; encontrado: 531.2; peso de la muestra (mg): 2.15  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{32}\text{H}_{28}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_4+\text{H}]^+$  581.2; encontrado: 581.2; peso de la muestra (mg): 1.68

20

25

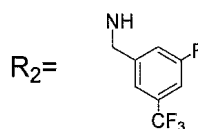


30



35

40



45

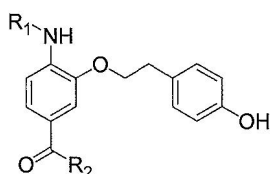
50

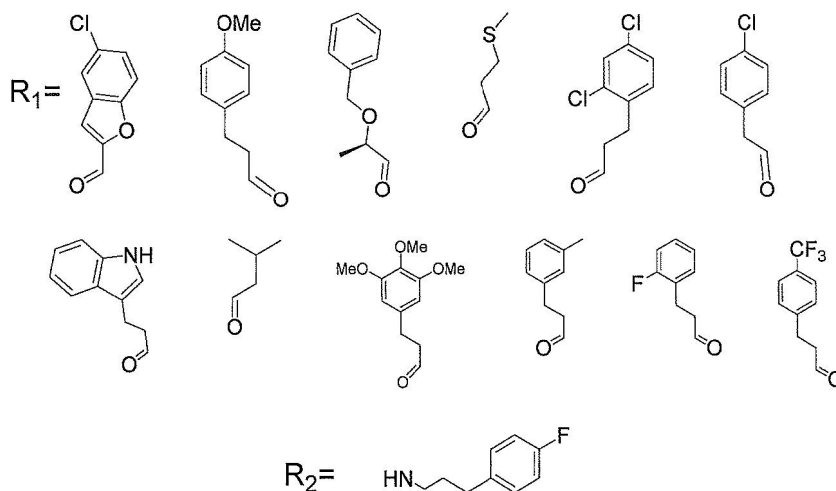
55

MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{32}\text{H}_{23}\text{ClF}_4\text{N}_2\text{O}_5+\text{H}]^+$  627.1; encontrado: 627.1; peso de la muestra (mg): 2.53  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_5+\text{H}]^+$  611.2; encontrado: 611.2; peso de la muestra (mg): 3.19  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_5+\text{H}]^+$  611.2; encontrado: 611.2; peso de la muestra (mg): 2.29  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_4\text{S}+\text{H}]^+$  551.1; encontrado: 551.16; peso de la muestra (mg): 2.29  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{ClF}_4\text{N}_2\text{O}_4+\text{H}]^+$  649.1; encontrado: 649.2; peso de la muestra (mg): 2.18  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{ClF}_4\text{N}_2\text{O}_4+\text{H}]^+$  601.1; encontrado: 601.2; peso de la muestra (mg): 1.88  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{34}\text{H}_{29}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_4+\text{H}]^+$  620.2; encontrado: 620.2; peso de la muestra (mg): 1.43  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_4+\text{H}]^+$  533.2; encontrado: 533.2; peso de la muestra (mg): 2.81  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_7+\text{H}]^+$  671.2; encontrado: 671.2; peso de la muestra (mg): 3.18  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_4+\text{H}]^+$  595.2; encontrado: 595.2; peso de la muestra (mg): 2.76  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{32}\text{H}_{27}\text{F}_5\text{N}_2\text{O}_4+\text{H}]^+$  599.2; encontrado: 599.2; peso de la muestra (mg): 2.43  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[\text{C}_{33}\text{H}_{27}\text{F}_7\text{N}_2\text{O}_4+\text{H}]^+$  649.2; encontrado: 649.2; peso de la muestra (mg): 6.12

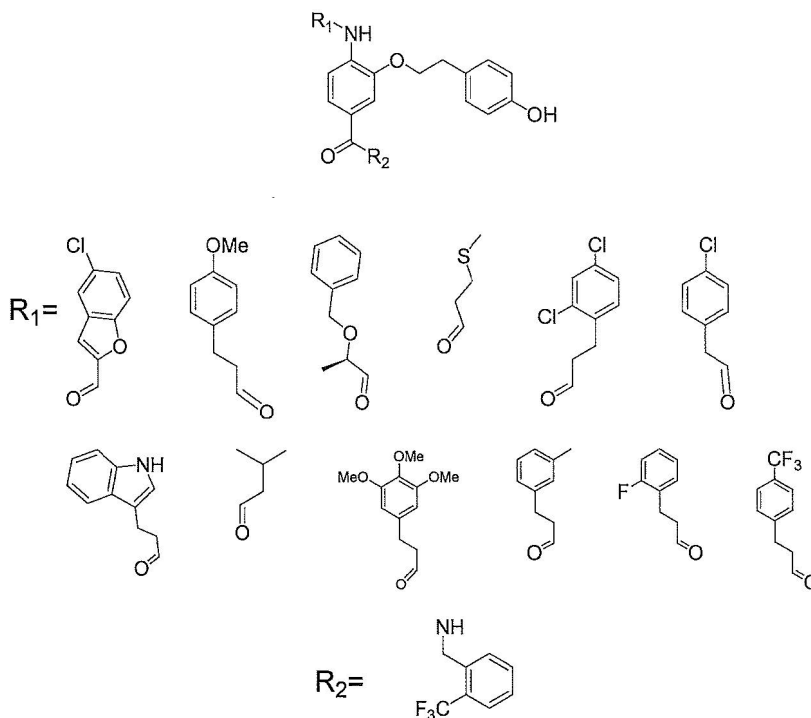
60

65



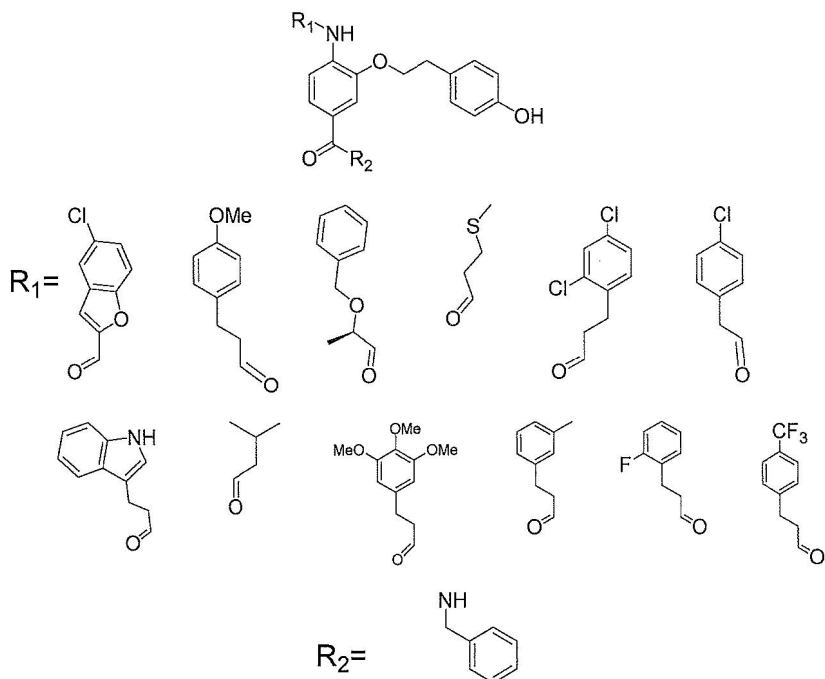


MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{28}ClFN_2O_5+H]^+$  587.2 encontrado: 587.2; peso de la muestra (mg): 2.79  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{35}FN_2O_5+H]^+$  571.2; encontrado: 571.2; peso de la muestra (mg): 2.18  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{35}FN_2O_5+H]^+$  571.2; encontrado: 571.2; peso de la muestra (mg): 3.12  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{28}H_{31}FN_2O_4S+H]^+$  511.2 encontrado: 511.2; peso de la muestra (mg): 1.69  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{31}Cl_2FN_2O_4+H]^+$  609.2; encontrado: 609.2; peso de la muestra (mg): 3.08  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{30}ClFN_2O_4+H]^+$  561.1; encontrado: 561.1; peso de la muestra (mg): 1.78  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{35}H_{34}FN_3O_4+H]^+$  580.2; encontrado: 580.2 peso de la muestra (mg): 2.84  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{29}H_{33}FN_2O_4+H]^+$  493.2; encontrado: 493.2; peso de la muestra (mg): 1.98  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{36}H_{39}FN_2O_7+H]^+$  631.2; encontrado: 631.2; peso de la muestra (mg): 2.26  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{35}FN_2O_4+H]^+$  555.2; encontrado: 555.2; peso de la muestra (mg): 2.97  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{32}F_2N_2O_4+H]^+$  559.2; encontrado: 559.2; peso de la muestra (mg): 5.6  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{32}F_4N_2O_4+H]^+$  609.2; encontrado: 609.2; peso de la muestra (mg): 0.98

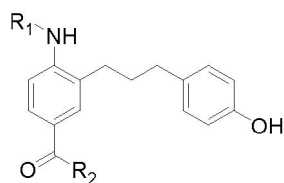


MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{24}ClF_3N_2O_5+H]^+$  609.1; encontrado: 609.1 peso de la muestra (mg) :2.49  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{31}F_3N_2O_5+H]^+$  593.2; encontrado: 593.2; peso de la muestra (mg): 2.35  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{31}F_3N_2O_5+H]^+$  593.2; encontrado: 593.2; peso de la muestra (mg): 2.15  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{27}H_{27}F_3N_2O_4S+H]^+$  533.1; encontrado: 533.1; peso de la muestra (mg): 1.93

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{27}Cl_2F_3N_2O_4+H]^+$  + 631.2; encontrado: 631.2; peso de la muestra (mg): 3.13  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{31}H_{26}ClF_3N_2O_4+H]^+$  + 583.1; encontrado: 583.1; peso de la muestra (mg): 1.98  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{30}F_3N_3O_4+H]^+$  + 602.2; encontrado: 602.2; peso de la muestra (mg): 2.62  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{28}H_{29}F_3N_2O_4+H]^+$  + 515.2; encontrado: 515.2; peso de la muestra (mg): 2.93  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{36}N_2O_7+H]^+$  + 585.2 encontrado: 585.2 peso de la muestra (mg): 1.96  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{31}F_3N_2O_4+H]^+$  + 577.2; encontrado: 577.2; peso de la muestra (mg): 2.48  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{28}F_4N_2O_4+H]^+$  + 581.2; encontrado: 581.2; peso de la muestra (mg): 1.97  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{28}F_6N_2O_4+H]^+$  + 631.2; encontrado: 631.2; peso de la muestra (mg): 2.64



MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{31}H_{25}ClN_2O_5+H]^+$  + 541.1; encontrado: 541.1; peso de la muestra (mg): 4.18  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{32}N_2O_5+H]^+$  + 525.2; encontrado: 525.2; peso de la muestra (mg): 1.94  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{32}N_2O_5+H]^+$  + 525.2; encontrado: 525.2; peso de la muestra (mg): 2.15  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{26}H_{28}N_2O_4S+H]^+$  + 464.1 encontrado: 464.1; peso de la muestra (mg): 1.83  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{31}H_{28}Cl_2N_2O_4+H]^+$  + 563.2; encontrado: 563.2; peso de la muestra (mg): 2.82  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{30}H_{27}ClN_2O_4+H]^+$  + 515.1; encontrado: 515.1; peso de la muestra (mg): 2.28  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{31}N_3O_4+H]^+$  + 534.2; encontrado: 534.2; peso de la muestra (mg): 1.89  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{28}H_{29}F_3N_2O_4+H]^+$  + 447.2; encontrado: 447.2; peso de la muestra (mg): 1.73  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{36}N_2O_7+H]^+$  + 585.2 encontrado: 585.2 peso de la muestra (mg): 1.96  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{32}N_2O_4+H]$  509.2; encontrado: 509.2; peso de la muestra (mg): 2.33  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $C_{31}H_{29}FN_2O_4 [M+H]^+$ ; 513.2; encontrado: 513.2; peso de la muestra (mg): 3.35  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{29}F_3N_2O_4+H]$  563.2; encontrado: 563.2; peso de la muestra (mg): 6.12

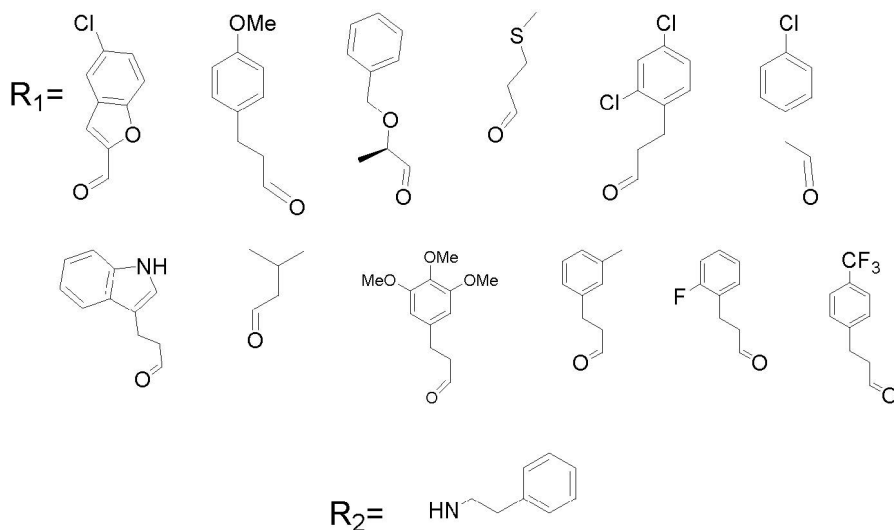


5

10

15

20



25

30

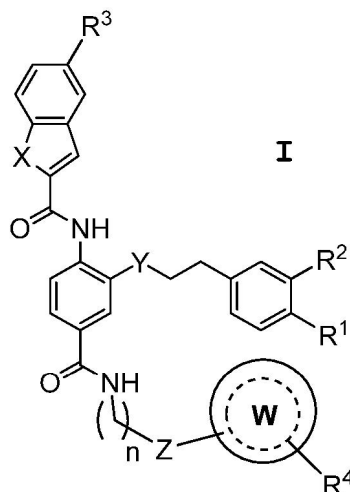
35

MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{27}ClN_2O_5+H]^+$  555.1; encontrado: 555.1; peso de la muestra (mg): 1.2  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{34}N_2O_5+H]^+$  539.9; encontrado: 539.2 peso de la muestra (mg): 1.86  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{34}N_2O_5+H]^+$  539.9; encontrado: 539.2 peso de la muestra (mg): 2.28  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{27}H_{30}N_2O_4S+H]^+$  479.2; encontrado: 479.2 peso de la muestra (mg) :2.21  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{30}Cl_2N_2O_4+H]^+$  577.2; encontrado: 577.2; peso de la muestra (mg): 2.04  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{31}H_{29}ClN_2O_4+H]^+$  529.2; encontrado: 529.2; peso de la muestra (mg): 1.18  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{34}H_{33}N_3O_4+H]^+$  548.2; encontrado: 548.2; peso de la muestra (mg): 1.89  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{28}H_{32}N_2O_4+H]^+$  461.2; encontrado: 461.2; peso de la muestra (mg): 2.04  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{40}H_{40}N_2O_7+H]^+$  599.2 encontrado: 599.2 peso de la muestra (mg): 1.98  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{34}N_2O_4+H]^+$  523.2; encontrado: 523.2; peso de la muestra (mg) :1.83  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{32}H_{31}FN_2O_4+H]^+$  527.2; encontrado: 527.2; peso de la muestra (mg): 2.98  
 MS-ESI (m/z) calculado para  $[C_{33}H_{31}F_3N_2O_4+H]^+$  577.2; encontrado: 577.2; peso de la muestra (mg) : 2.74

Se pretende que la descripción anterior y los ejemplos sean ilustrativos

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que corresponde en estructura a la Fórmula I, a continuación, o su sal farmacéuticamente aceptable



en donde:

**X** es O, S, NR<sup>5</sup>, o CH<sub>2</sub>, donde R<sup>5</sup> es hidrido (H), o hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

**Y** es O, CH<sub>2</sub> o está ausente;

**Z** es O, S, NR<sup>6</sup>, o CH<sub>2</sub>, donde R<sup>6</sup> es hidrido (H), o hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

**n** es un número que es cero, 1 o 2, pero **n** solo es cero cuando **Z** es CH<sub>2</sub>;

**R**<sup>1</sup> es H u OH, **R**<sup>2</sup> es H u OH, o **R**<sup>1</sup> es OH y **R**<sup>2</sup> es OH, pero por lo menos uno de **R**<sup>1</sup> y **R**<sup>2</sup> es OH;

**R**<sup>3</sup> es hidrido (H), halógeno, azido, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o trifluorometilo;

**R**<sup>4</sup> es hidrido, halógeno, azido, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o trifluorometilo;

**W** es una estructura de anillo que contiene uno o dos anillos e incluye de 5 a 12 átomos en la estructura del anillo, en donde dicha estructura **W** contiene opcionalmente a) 1, 2, 3 o 4 heteroátomos que son independientemente oxígeno, nitrógeno o azufre, y contiene b) de uno a tres grupos sustituyentes, a los que se hace referencia colectivamente como **R**<sup>4</sup>, que incluyen uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidrido, hidroxilo, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, hidrocarbilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, halógeno y trifluorometilo unidos a uno o más átomos del anillo y la línea de puntos (----) representa uno o más enlaces etilénicos (-C=C-) presentes opcionalmente.

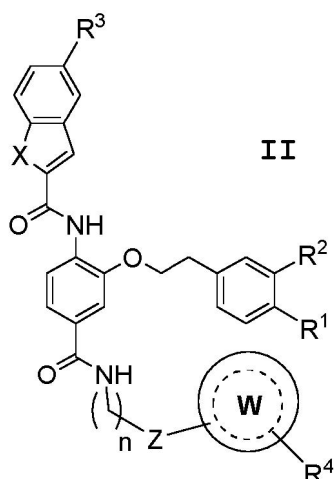
2. El compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, en donde **X** es O o NR<sup>5</sup>.

3. El compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, en donde **Y** es O.

4. El compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la estructura de anillo **W** contiene de 5 a 10 átomos en la estructura de anillo.

5. El compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, en donde **W** es una estructura anillo simple.

6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que corresponde en estructura a la Fórmula II, a continuación, o su sal farmacéuticamente aceptable



donde **W**, **Z**,  $n$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  son como se han definido anteriormente, y **X** es O o  $NR^5$ .

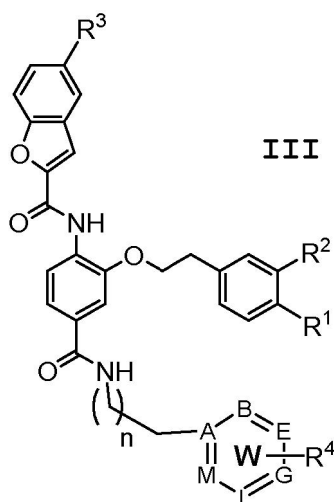
7. El compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 6, en donde **W** es una estructura de anillo aromático simple de seis miembros.

8. El compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 6, en donde **X** es O.

9. El compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 6, en donde **Z** es  $CH_2$ .

10. El compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la estructura de anillo **W** contiene un único sustituyente  $R^4$  que es hidruro o halo.

11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que corresponde en estructura a la Fórmula III, a continuación, o su sal farmacéuticamente aceptable



en donde  $n$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$  son como se definen en la Fórmula I, y **W** es una estructura de anillo aromático de seis miembros cuyos átomos del anillo: A, B, E, G, L y M son átomos de carbono (C) o de nitrógeno (N), con no más de dos de A, B, E, G, L y M siendo nitrógeno.

12. El compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha estructura de anillo aromático de seis miembros **W** es un grupo fenilo.

13. El compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 12, en donde  $R^4$  es un solo único sustituyente que es un halógeno en *meta*- o *para*-sustituido, azido, hidrocarbilo  $C_1-C_4$ , hidrocarbilo  $C_1-C_4$  o un grupo trifluorometilo.

14. El compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 11, en donde  $R^2$  es hidruro y  $R^1$  es hidroxilo.

15. El compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, correspondiente en estructura a la siguiente fórmula estructural, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

5

10

15

20

25

30

35

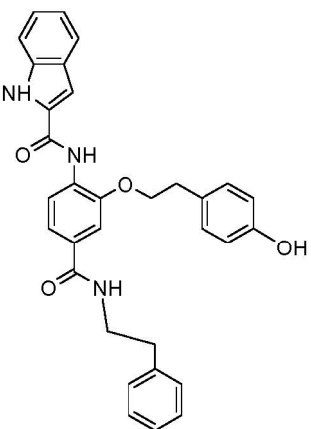
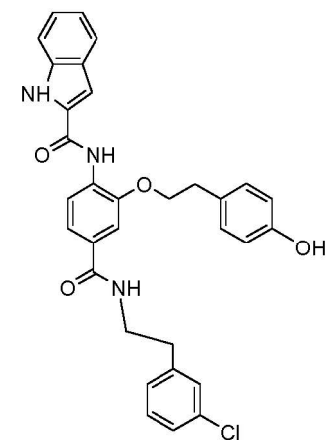
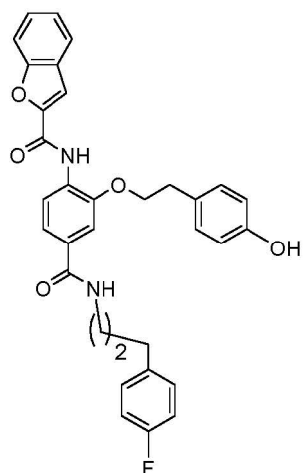
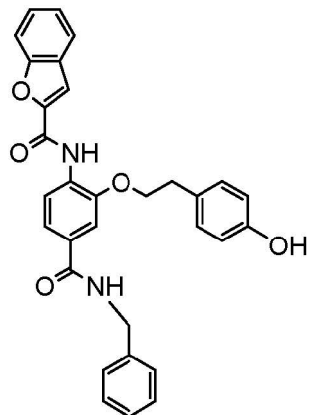
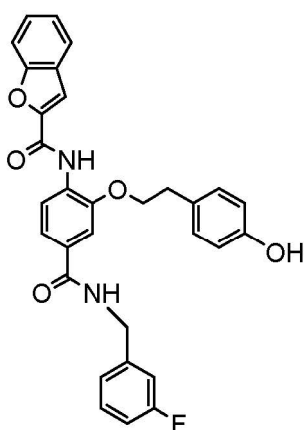
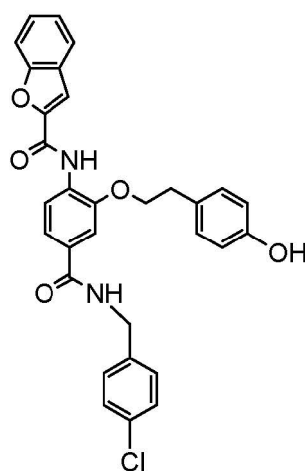
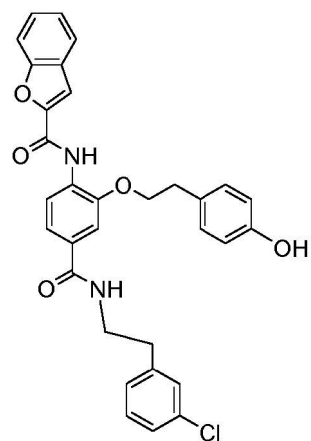
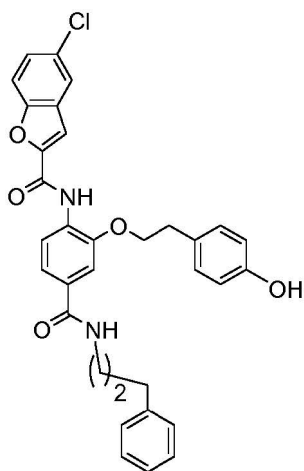
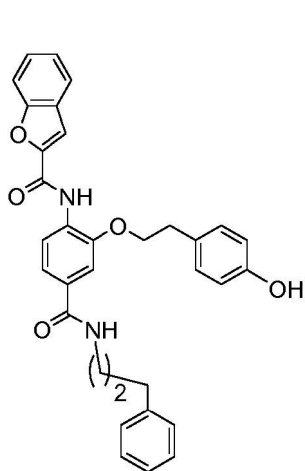
40

45

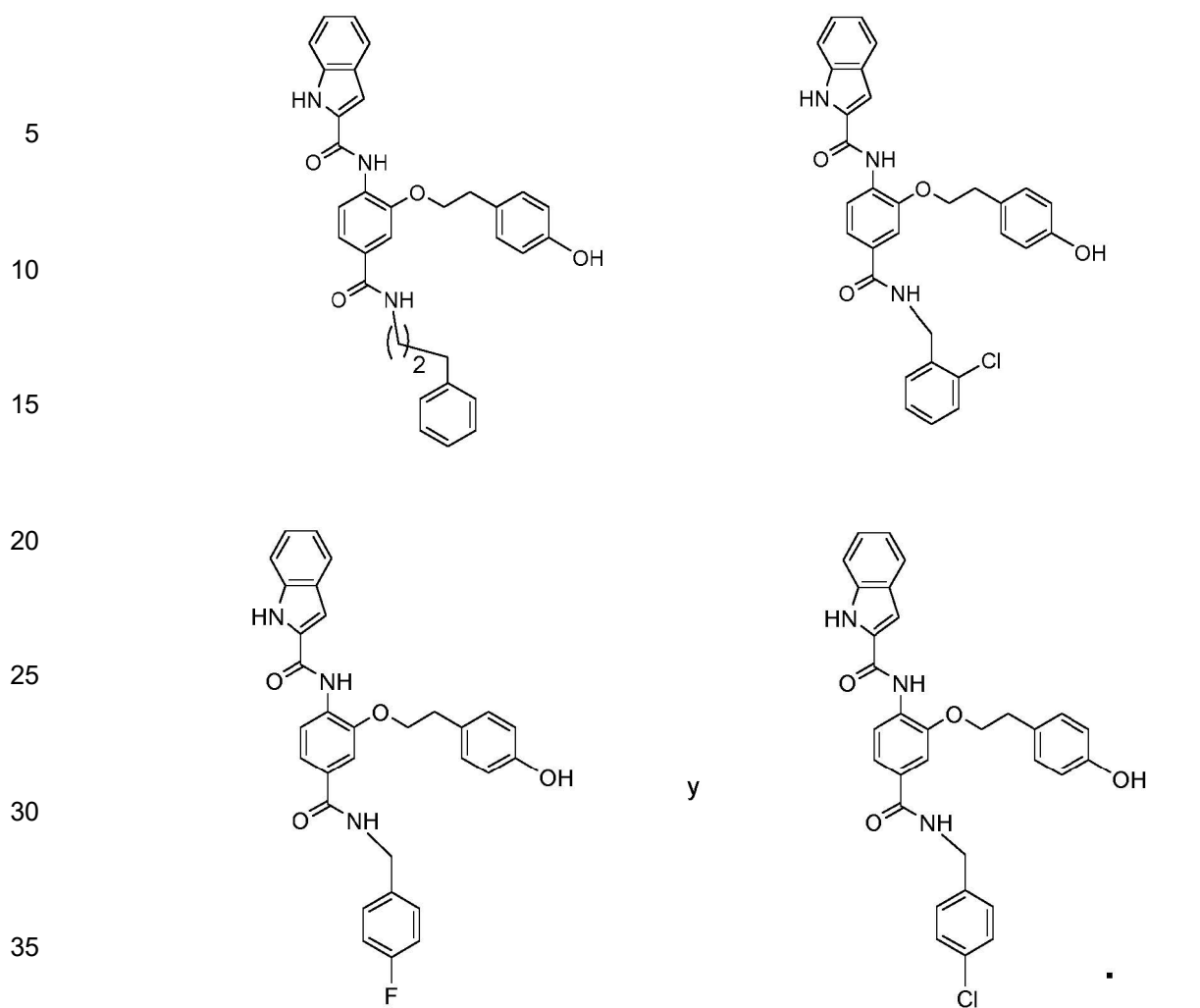
50

55

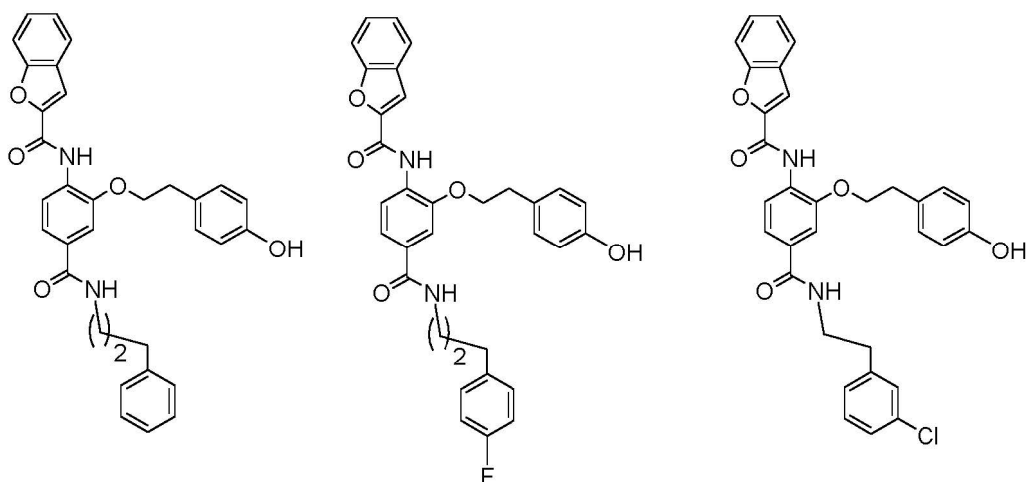
60

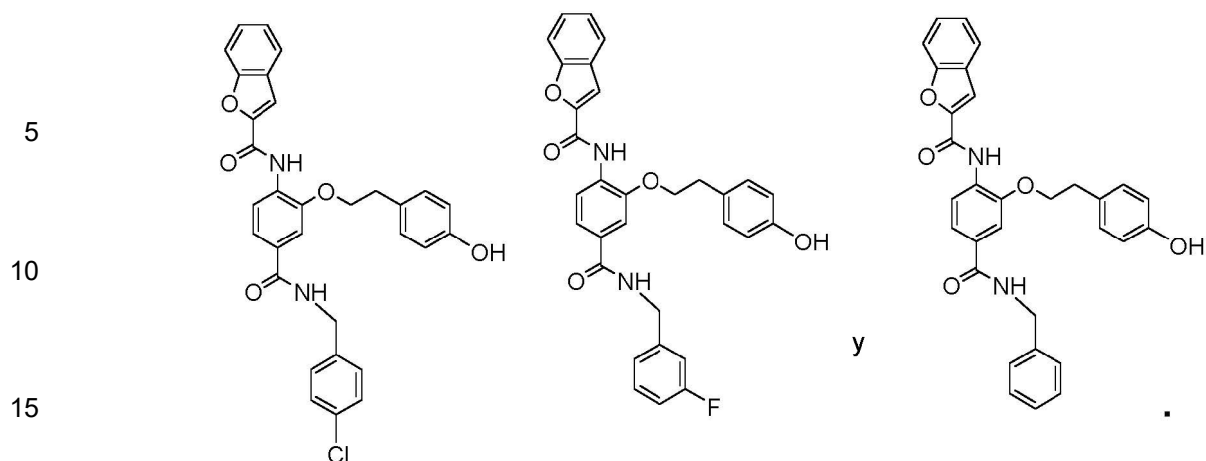






40 16. El compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1, correspondiente en estructura a la siguiente fórmula estructural, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo



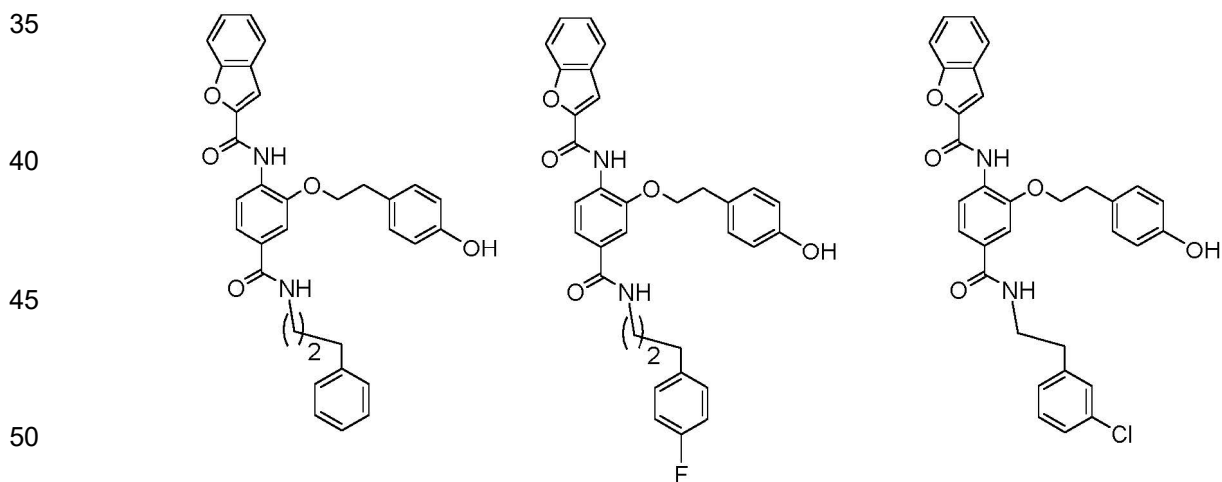


20 17. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz como adyuvante de un compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo disuelta o dispersa en un portador fisiológicamente aceptable.

25 18. Un compuesto de la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como adyuvante en un método de vacunación en donde las células de mamífero con necesidad de vacunación se ponen en contacto con una composición inmunizante que comprende una cantidad eficaz de un inmunógeno y una cantidad eficaz del adyuvante.

30 19. El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de la reivindicación 18, en donde dicho inmunógeno y dicho adyuvante se administran en la misma composición.

20. El compuesto o la sal del mismo farmacéuticamente aceptable para el uso de la reivindicación 18, en donde dicho adyuvante corresponde en estructura a una fórmula estructural a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



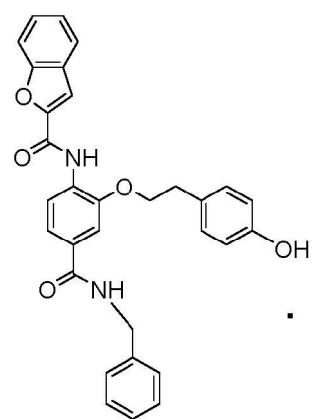
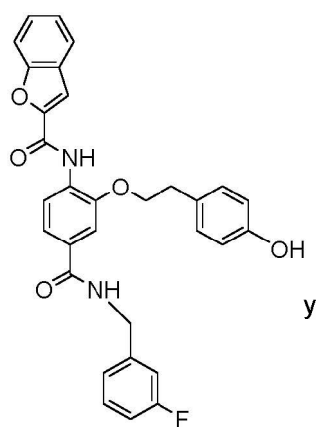
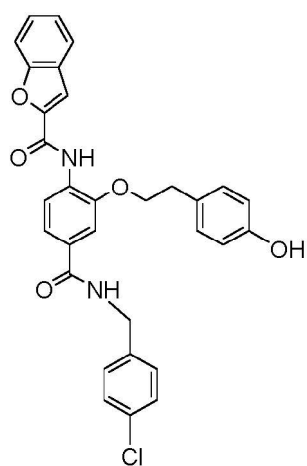
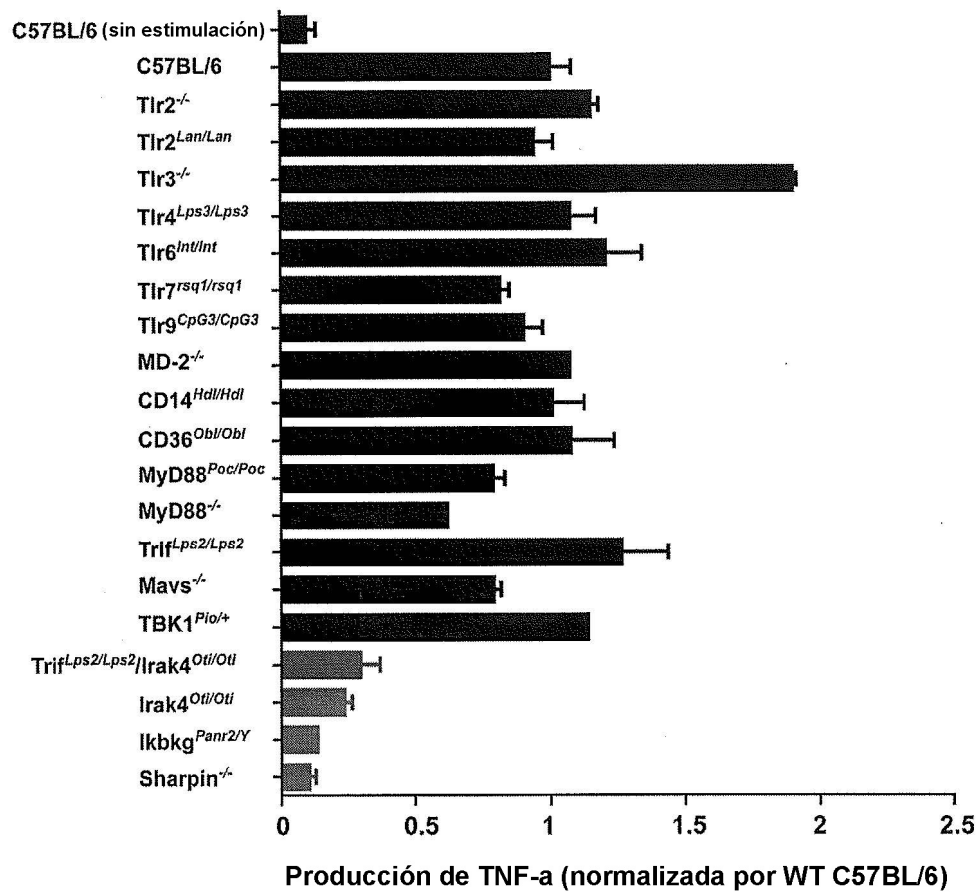
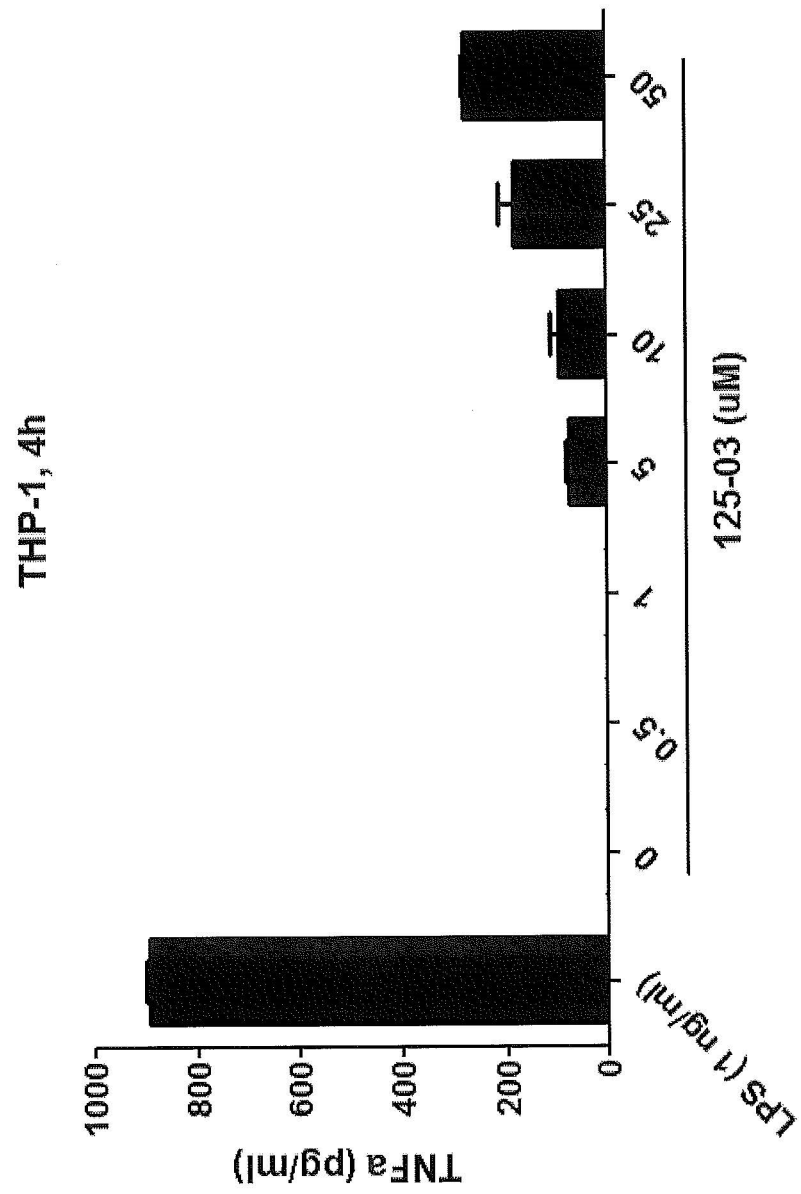


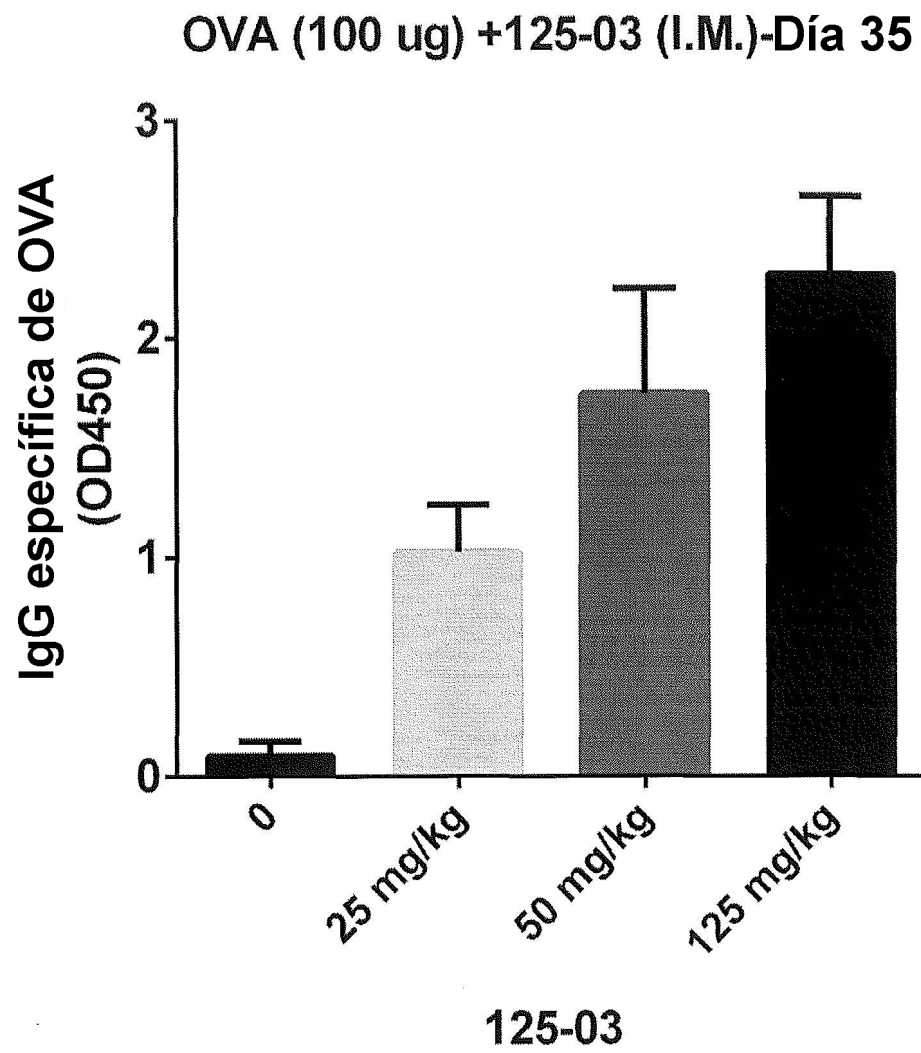
Fig. 1



**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**