

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 908 984**

51 Int. Cl.:

C07D 473/18 (2006.01)

A61K 31/522 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.08.2018** **PCT/US2018/000310**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2019** **WO19036023**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2018** **E 18779824 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.02.2022** **EP 3668872**

54 Título: **Derivados de 6-amino-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona como agonistas inmonoestimulantes del receptor tipo toll 7 (TLR7)**

30 Prioridad:

16.08.2017 US 201762546095 P

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

04.05.2022

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

72 Inventor/es:

POUDEL, YAM, B.;
GANGWAR, SANJEEV;
SIVAPRAKASAM, PRASANNA y
POSY, SHOSHANA, L.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 908 984 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de 6-amino-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona como agonistas inmonoestimulantes del receptor tipo toll 7 (TLR7)

5 Antecedentes de la invención

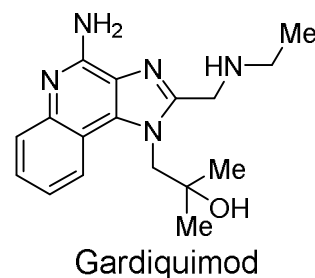
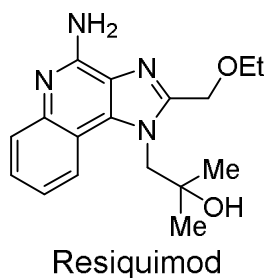
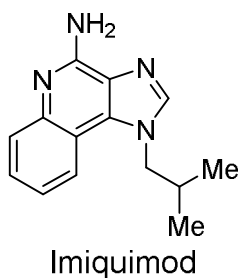
La presente divulgación se refiere a agonistas del receptor tipo toll 7 ("TLR7") y conjugados de estos, y métodos para la preparación y el uso de tales agonistas y sus conjugados.

10 Los receptores tipo toll ("TLR") son receptores de la superficie celular que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos ("PAMP"). La activación de un TLR mediante la fijación de un PAMP correspondiente indica una posible infección por un patógeno y estimula el sistema inmunitario para combatir la infección. Los seres humanos tienen 11 TLR, denominados TLR1 a TLR11.

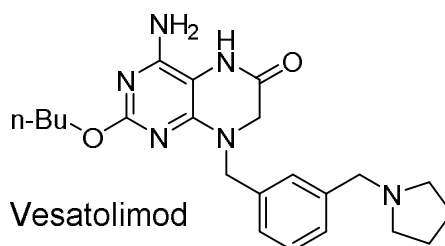
15 La activación de un TLR, en donde TLR7 es el más estudiado, por parte de un agonista puede tener un efecto adyuvante en la acción de las vacunas y los agentes inmunoterapéuticos para tratar varias afecciones que no sean la infección patógena real, estimulando la respuesta inmunitaria.

20 TLR7 reconoce PAMP asociados a virus de ARN monocatenario. Su activación induce la secreción de interferones de tipo I tales como IFN α e IFN β (Lund *et al.* 2004). Tiene dos sitios de fijación, uno para ligandos de ARN monocatenario tales como ssRNA40 (Berghöfer *et al.* 2007) y uno para guanosina (Zhang *et al.* 2016).

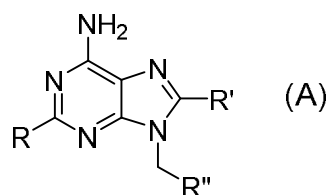
25 TLR7 se puede fijar a, y se puede activar mediante, agonistas sintéticos tipo guanosina tales como imiquimod, resiquimod y gardiquimod, basados en una estructura de 1H-imidazo[4,5-c]quinolina.



30 Los agonistas de TLR7 sintéticos basados en una estructura molecular de pteridinona son también conocidos, como se ejemplifica con vesatolimod (Desai *et al.* 2015), que está presente en ensayos clínicos de fase 2. Se informa que la potencia de vesatolimod es 100X menor que la del compuesto de purin-8-ona correspondiente, según se midió mediante inducción de IFN- α (Roethle *et al.* 2013).



35 Otros agonistas de TLR7 sintéticos están basados en una estructura tipo purina, frecuentemente de acuerdo con la Fórmula (A):

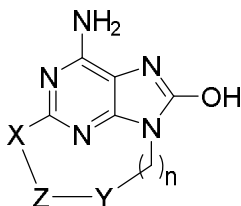


40 en donde R, R' y R'' son variables estructurales, en donde R'' contiene generalmente un anillo aromático o heteroaromático sustituido o no sustituido.

Las divulgaciones de moléculas bioactivas que tienen una estructura tipo purina y sus usos para tratar afecciones tales como fibrosis, trastornos inflamatorios, cáncer o infecciones patógenas incluyen: Akinbobuyi *et al.* 2015b y 2016; Barberis *et al.* 2012; Carson *et al.* 2014; Ding *et al.* 2016, 2017a y 2017b; Graupe *et al.* 2015; Hashimoto *et al.* 2009; Holldack *et al.* 2012; Isobe *et al.* 2009a y 2012; Jin *et al.* 2017a y 2017b; Peterson 2014; Pryde 2010; y Seifert 2015.

5 El grupo R" puede ser piridilo: Bonfanti *et al.* 2015a y 2015b; Halcomb *et al.* 2015; Hirota *et al.* 2000; Isobe *et al.* 2000, 2002, 2004, 2006, 2009a, 2011 y 2012; Kasibhatla *et al.* 2007; Koga-Yamakawa *et al.* 2013; Musmuca *et al.* 2009; Nakamura 2012; Ogita *et al.* 2007; y Yu *et al.* 2013.

10 Bonfanti *et al.* 2015b describen moduladores de TLR7 en donde los dos anillos de una porción purina están atravesados por un macrociclo:



15 Un agonista de TLR7 se puede conjugar con una molécula asociada, que puede ser, por ejemplo, un fosfolípido, un poli(etilenglicol) ("PEG") u otro TLR (comúnmente TLR2). Las divulgaciones de ejemplo incluyen: Carson *et al.* 2013, 2015 y 2016, Chan *et al.* 2009 y 2011, Lioux *et al.* 2016, Maj *et al.* 2015, Ban *et al.* 2017; Vernejoul *et al.* 2014 y Zurawski *et al.* 2012. La conjugación con un anticuerpo se puede describir en: Akinbobuyi *et al.* 2013 y 2015a, y Gadd *et al.* 2015. Un sitio de conjugación frecuente es en el grupo R" de la Fórmula (A).

20 También se describieron agonistas de TLR7 basados en una estructura 5H-pirrólo[3,2-d]pirimidina. Véase Cortez *et al.* 2017a y 2017b, McGowan *et al.* 2017, y Li *et al.* 2018.

Jensen *et al.* 2015 describen el uso de vehículos lipídicos catiónicos para la administración de agonistas de TLR7.

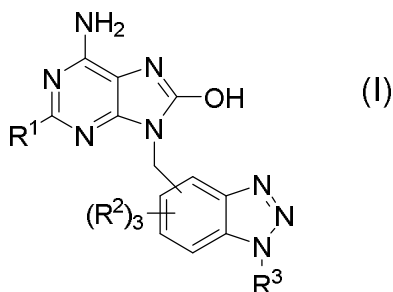
25 Algunos agonistas de TLR7, que incluyen resiquimod son agonistas duales de TLR7/TLR8. Véase, por ejemplo, Beesu *et al.* 2017; Lioux *et al.* 2016; y Vernejoul *et al.* 2014.

También se describieron agonistas de TLR7 basados en una estructura 5H-pirrólo[3,2-d]pirimidina. Véase Cortez *et al.* 2017a y 2017b, McGowan *et al.* 2017, y Li *et al.* 2018.

30 Las referencias completas de los documentos citados en la presente por primer autor o inventor y año se enumeran al final de la presente memoria descriptiva.

35 Síntesis de la invención

En un aspecto, esta memoria descriptiva proporciona compuestos que tienen una estructura de acuerdo con la Fórmula (I)

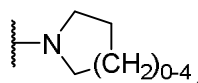


40

en donde

45 R¹ es (C₁-C₅ alquil)O, (C₁-C₂ alquil)O(CH₂)₂₋₃O, (C₁-C₅ alquil)C(=O)O, (C₁-C₅ alquil)NH, (C₁-C₂ alquil)O(CH₂)₂₋₃NH o (C₁-C₅ alquil)C(=O)NH;
 R² es, independientemente de cada caso, H, C₁-C₃ alquilo, halo, O(C₁-C₃ alquilo), CN o NO₂;
 R³ es H, Me o (CH₂)_xR⁴, en donde el subíndice x es 2, 3 o 4; y
 R⁴ es H, halo, OH, CN, NH₂, NH(C₁-C₅ alquilo), N(C₁-C₅ alquilo)₂, NH(C₃-C₆ cicloalquilo), NH(C₄-C₈ bicicloalquilo), NH(C₆-C₁₀ espirocicloalquilo), N(C₃-C₆ cicloalquilo)₂, NH(CH₂)₁₋₃(arilo), N((CH₂)₁₋₃(arilo))₂, una porción amina

cíclica que tiene la estructura



5 una porción aromática o heteroaromática de 6 miembros o una porción heteroaromática de 5 miembros;

en donde

10 una porción alquilo, cicloalquilo, bicicloalquilo, espirocicloalquilo, amina cíclica, aromática o heteroaromática de 6 miembros o heteroaromática de 5 miembros se sustituye opcionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados de OH, halo, CN, (C₁-C₃ alquilo), O(C₁-C₃ alquilo), C(=O)(Me), SO₂(C₁-C₃ alquilo), C(=O)(Et), NH₂, NH(Me), N(Me)₂, NH(Et), N(Et)₂ y N(C₁-C₃ alquilo)₂; y una porción cicloalquilo, bicicloalquilo, espirocicloalquilo o amina cíclica puede tener un grupo CH₂ reemplazado por O, S, NH, N(C₁-C₃ alquilo) o N(Boc).

15 Los compuestos de acuerdo con la Fórmula (I) tienen actividad como agonistas de TLR7 y, consecuentemente, algunos de ellos se pueden conjugar para la administración dirigida a un tejido u órgano diana de acción prevista. Por ende, se pueden usar en el tratamiento de afecciones susceptibles a tratamiento mediante activación del sistema inmunitario.

20 Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra un esquema representativo para preparar compuestos de esta divulgación.

La **Figura 2** y la **Figura 3** muestran esquemas para la preparación de compuestos ligador-agonista.

25 La **Figura 4** es un gráfico representativo que muestra la actividad agonista de TLR7 de un compuesto de la presente invención.

30 Descripción detallada de la invención

DEFINICIONES

"Anticuerpo" significa anticuerpos completos y cualquier fragmento de fijación al antígeno (es decir, "porción de fijación al antígeno") o variantes monocatenarias de estos. Un anticuerpo completo es una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por puentes disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (V_H) y una región constante de la cadena pesada que comprende tres dominios, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Cada cadena liviana comprende una región variable de la cadena liviana (V_L o V_k) y una región constante de la cadena liviana que comprende un dominio único, C_L. Las regiones V_H y V_L también se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones marco (FR) más conservadas. Cada V_H y V_L comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino al terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables contienen un dominio de fijación que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes pueden mediar la fijación del anticuerpo con los factores o tejidos huésped, que incluyen varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. Se dice que un anticuerpo "se fija específicamente" a un antígeno X si el anticuerpo se fija al antígeno X con una K_D de 5 x 10⁻⁸ M o menos, con mayor preferencia, 1 x 10⁻⁸ M o menos, con mayor preferencia, 6 x 10⁻⁹ M o menos, con mayor preferencia, 3 x 10⁻⁹ M o menos, aun con mayor preferencia, 2 x 10⁻⁹ M o menos. El anticuerpo puede ser quimérico, humanizado o, preferentemente, humano. La región constante de la cadena pesada se puede modificar por ingeniería genética para afectar el tipo o el alcance de la glucosilación, para extender la semivida del anticuerpo, para mejorar o reducir las interacciones con las células efectoras o el sistema de complementos, o para modular otras propiedades. La modificación por ingeniería genética se puede lograr mediante reemplazo, adición o eliminación de uno o más aminoácidos o mediante el reemplazo de un dominio por otro dominio de otro tipo de inmunoglobulina, o una combinación de los anteriores.

55 "Fragmento de fijación al antígeno" y "porción de fijación al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo") significan uno o más fragmentos que retienen la capacidad de fijarse específicamente a un antígeno. Se demostró que la función de fijación al antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa, tal como (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, por ejemplo, Abbas *et al.*, *Cellular and Molecular Immunology*, 6.^a ed., Saunders Elsevier 2007); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1}; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio V_H; (vii) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada; y (viii) un

nanocuerpo, una región variable de la cadena pesada que contiene un solo dominio variable y dos dominios constantes. Los fragmentos de fijación al antígeno preferidos son los fragmentos Fab, F(ab')₂, Fab', Fv y Fd. Además, si bien los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, son codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que permite obtenerlos como una cadena proteica simple en donde las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como cadena simple Fv o scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:5879-5883). La expresión "porción de fijación al antígeno" de un anticuerpo también abarca los anticuerpos monocatenarios.

A menos que se indique lo contrario, por ejemplo, con referencia a la numeración lineal en un listado de SEQ ID NO:, las referencias a la numeración de las posiciones de aminoácidos en una región variable de las cadenas pesada o liviana (V_H o V_L) del anticuerpo son de acuerdo con el sistema Kabat (Kabat *et al.*, "Sequences of proteins of immunological interest, 5.^a ed., Pub. N.º 91-3242, U.S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, Md., 1991, en adelante "Kabat"), y las referencias a la numeración de las posiciones de aminoácidos en una región constante de las cadenas pesada y liviana (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} o C_L) del anticuerpo son de acuerdo con el índice EU como se indica en Kabat. Véase Lazar *et al.*, US 2008/0248028 A1, para ejemplos de dicho uso. Además, el Sistema de información ImMunoGeneTics (IMGT) proporciona en su sitio web un cuadro titulado "Cuadro científico IMGT: Relación entre numeraciones C" que muestra la relación entre su sistema de numeración, la numeración EU y la numeración Kabat para la región constante de la cadena pesada.

Un "anticuerpo aislado" significa un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se fija específicamente al antígeno X está sustancialmente libre de anticuerpos que se fijan específicamente a antígenos que no son el antígeno X). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se fija específicamente al antígeno X puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tal como las moléculas del antígeno X de otras especies. En ciertos ejemplos, un anticuerpo aislado se fija específicamente al antígeno X humano y no tiene reactividad cruzada con otros antígenos X (no humanos). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros productos químicos y/o materiales celulares.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales" se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de una composición de moléculas simples, que exhibe una afinidad y especificidad de fijación simple para un epítipo particular.

La expresión "anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene regiones variables en donde tanto las regiones marco como las regiones CDR (y la región constante, si está presente) derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir modificaciones tardías, que incluyen modificaciones naturales o sintéticas. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano" no incluye anticuerpos en los cuales las secuencias CDR que derivan de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se injertaron en secuencias de marco humanas.

La expresión "anticuerpo monoclonal humano" significa un anticuerpo que muestra especificidad de fijación simple, que tiene regiones variables en donde tanto las regiones marco como las regiones CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden producir mediante un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena liviana fusionado a una célula inmortalizada.

El término "alifática" significa una porción hidrocarburo no aromática, saturada o insaturada, de cadena lineal o ramificada, que tiene la cantidad de átomos de carbono especificada (por ejemplo, como en "C₃ alifática", "C₁₋₅ alifática", "C₁-C₅ alifática" o "C₁ a C₅ alifática"; las últimas tres frases son sinónimos de una porción alifática que tiene de 1 a 5 átomos de carbono) o, cuando la cantidad de átomos de carbono no se indica explícitamente, de 1 a 4 átomos de carbono (2 a 4 carbonos en el caso de porciones alifáticas insaturadas). Un conocimiento similar se aplica a la cantidad de carbonos en otros tipos, como en C₂₋₄ alqueno, C₄-C₇ cicloalifático, etc. De manera similar, un término como "(CH₂)₁₋₃" debe entenderse como una forma breve de decir que el subíndice es 1, 2 o 3, de modo que ese término representa CH₂, CH₂CH₂ y CH₂CH₂CH₂.

El término "alquilo" significa una porción alifática saturada, y se aplica la misma convención para la designación de la cantidad de átomos de carbono. A modo ilustrativo, las porciones C₁-C₄ alquilo incluyen, entre otras, metilo, etilo, propilo, isopropilo, isobutilo, *t*-butilo, 1-butilo, 2-butilo y similares. El término "alquileo" significa una contraparte divalente de un grupo alquilo, tal como CH₂CH₂, CH₂CH₂CH₂ y CH₂CH₂CH₂CH₂.

El término "alqueno" significa una porción alifática que tiene al menos un enlace doble carbono-carbono, con la misma convención para designar la cantidad de átomos de carbono. A modo ilustrativo, las porciones C₂-C₄ alqueno incluyen, entre otras, etenilo (vinilo), 2-propenilo (alilo o prop-2-enilo), *cis*-1-propenilo, *trans*-1-propenilo, E- (o Z-) 2-butenilo, 3-butenilo, 1,3-butadienilo (but-1,3-dienilo) y similares.

El término "alquinilo" significa una porción alifática que tiene al menos un enlace triple carbono-carbono, con la misma convención para designar la cantidad de átomos de carbono. A modo ilustrativo, los grupos C₂-C₄ alquinilo incluyen etinilo (acetilenilo), propargilo (prop-2-inilo), 1-propinilo, but-2-inilo y similares.

El término "cicloalifático" significa una porción de hidrocarburo no aromático saturado o insaturado que tiene de 1 a 3 anillos, en donde cada anillo tiene de 3 a 8 (preferentemente, de 3 a 6) átomos de carbono. El término "cicloalquilo" significa una porción cicloalifática en donde cada anillo está saturado. El término "cicloalquenilo" significa una porción cicloalifática en donde al menos un anillo tiene al menos un enlace doble carbono-carbono. El término "cicloalquinilo" significa una porción cicloalifática en donde al menos un anillo tiene al menos un enlace triple carbono-carbono. A modo ilustrativo, las porciones cicloalifáticas incluyen, entre otras, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, ciclooctilo y adamantilo. Las porciones cicloalifáticas preferidas son cicloalquilo, en especial, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, y ciclohexilo. El término "cicloalquileo" significa una contraparte divalente de un grupo cicloalquilo.

El término "heterocicloalifática" significa una porción cicloalifática en donde, en al menos un anillo de esta, se reemplazaron hasta 3 (preferentemente de 1 a 2) carbonos por un heteroátomo seleccionado independientemente de N, O o S, en donde N y S se pueden oxidar opcionalmente, y N se puede cuaternizar opcionalmente. Las porciones cicloalifáticas preferidas consisten en un anillo, con un tamaño de 5 a 6 miembros. De modo similar, los términos "heterocicloalquilo", "heterocicloalquenilo" y "heterocicloalquinilo" significan una porción cicloalquilo, cicloalquenilo o cicloalquinilo, respectivamente, en donde se modificó al menos un anillo de aquella. Las porciones heterocicloalifáticas de ejemplo incluyen aziridinilo, azetidínilo, 1,3-dioxanilo, oxetanilo, tetrahidrofurilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidrotiopiranilsulfona, morfolinilo, tiomorfolinilo, sulfóxido de tiomorfolinilo, tiomorfolinilsulfona, 1,3-dioxolanilo, tetrahidro-1,1-dioxotienilo, 1,4-dioxanilo, tietanilo y similares. El término "heterocicloalquileo" significa una contraparte divalente de un grupo heterocicloalquilo.

Los términos "alcoxi", "ariloxi", "alquiltio" y "ariltio" significan -O(alquilo), -O(arilo), -S(alquilo) y -S(arilo), respectivamente. Los ejemplos son metoxi, fenoxi, metiltio y feniltio, respectivamente.

Los términos "halógeno" o "halo" significan flúor, cloro, bromo o yodo, a menos que se indique un significado más restrictivo.

El término "arilo" significa una porción de hidrocarburos que tiene un sistema de anillos mono-, bi- o tricíclicos (preferentemente, monocíclicos), en donde cada anillo tiene de 3 a 7 átomos de carbono y al menos un anillo es aromático. Los anillos del sistema de anillos se pueden fusionar (como en naftilo) o unir (como en bifenilo) entre sí, y se pueden fusionar o unir a anillos no aromáticos (como en indanilo o ciclohexilfenilo). A modo ilustrativo, las porciones arilo incluyen, entre otras, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, bifenilo, fenantrilo, antracenilo y acenaftilo. El término "arileno" significa una contraparte divalente de un grupo arilo, por ejemplo 1,2-fenileno, 1,3-fenileno o 1,4-fenileno.

El término "heteroarilo" significa una porción que tiene un sistema de anillos mono-, bi- o tricíclicos (preferentemente, monocíclico de 5 a 7 miembros), en donde cada anillo tiene de 3 a 7 átomos de carbono, y al menos un anillo es un anillo aromático que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente de N, O o S, en donde N y S se pueden oxidar opcionalmente, y N se puede cuaternizar opcionalmente. Dicho al menos un anillo aromático que contiene un heteroátomo se puede fusionar a otros tipos de anillos (como en benzofuranilo o tetrahidroisoquinolilo) o unir directamente a otros tipos de anillos (como en fenilpiridilo o 2-ciclopentilpiridilo). A modo ilustrativo, las porciones heteroarilo incluyen pirrolilo, furanilo, tiofenilo (tienilo), imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, piridilo, N-oxopiridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, cinolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, benzofuranilo, indolilo, benzotiofenilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, fenotiazolilo, bencimidazolilo, benzotriazolilo, dibenzofuranilo, carbazolilo, dibenzotiofenilo, acridinilo y similares. El término "heteroarileno" significa una contraparte divalente de un grupo heteroarilo.

Cuando se indica que una porción se puede sustituir, por ejemplo, usando las frases "sustituido o no sustituido" u "opcionalmente sustituido" como en "C₁-C₅ alquilo sustituido o no sustituido" o "heteroarilo opcionalmente sustituido", esa porción puede tener uno o más sustituyentes seleccionados independientemente, con preferencia, de 1 a 5, con mayor preferencia, de 1 a 2. Una persona del oficio de nivel medio puede seleccionar sustituyentes y patrones de sustitución, teniendo en cuenta la porción a la que se une el sustituyente, para obtener compuestos químicamente estables y que se puedan sintetizar mediante técnicas conocidas en el estado de la técnica y mediante los métodos indicados en la presente. Cuando una porción se identifica como "no sustituida o sustituida" u "opcionalmente sustituida", en una forma de realización preferida, dicha porción es no sustituida.

Los términos "arilalquilo", "(heterocicloalifático)alquilo", "arilalquenilo", "arilalquinilo", "biarilalquilo" y similares significan una porción alquilo, alquenilo o alquinilo, según el caso, sustituida con una porción arilo, heterocicloalifática, biarilo, etc., según el caso, con la valencia abierta (no satisfecha) en la porción alquilo, alquenilo o alquinilo, por ejemplo, como en bencilo, fenetilo, N-imidazoiletilo, N-morfolinoetilo y similares. Por el contrario, los términos "alquilarilo", "alquenilcicloalquilo" y similares significan una porción arilo, cicloalquilo, etc., según el caso, sustituida con una porción

alquilo, alqueno, etc., según el caso, por ejemplo, como en metilfenilo (tolilo) o alilciclohexilo. Los términos "hidroxialquilo", "haloalquilo", "alquilarilo", "cianoarilo" y similares significan una porción alquilo, arilo, etc., según el caso, sustituida con uno o más de los sustituyentes identificados (hidroxilo, halo, etc., según el caso).

- 5 Por ejemplo, los sustituyentes permisibles incluyen, entre otros, alquilo (en especial, metilo o etilo), alqueno (en especial, alilo), alquino, arilo, heteroarilo, cicloalifáticos, heterocicloalifáticos, halo (en especial, fluoro), haloalquilo (en especial, trifluorometilo), hidroxilo, hidroxialquilo (en especial, hidroxietilo), ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo) (en especial, -OCF₃), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)₂, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, azido, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂, -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO₂(alquilo), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo), -SO₂N(alquilo)₂ y similares.

- 10 Cuando la porción que es sustituida es una porción alifática, los sustituyentes preferidos son arilo, heteroarilo, cicloalifáticos, heterocicloalifáticos, halo, hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), -O(arilo), alquiltio, ariltio, =O, =NH, =N(alquilo), =NOH, =NO(alquilo), -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)₂, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, azido, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂, -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(=O)alquilo, -S(cicloalquilo), -SO₂(alquilo), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo) y -SO₂N(alquilo)₂. Los sustituyentes de mayor preferencia son halo, hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(arilo), =O, =NOH, =NO(alquilo), -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, azido, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂, -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(=O)alquilo, -S(cicloalquilo), -SO₂(alquilo), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo) y -SO₂N(alquilo)₂. Los sustituyentes de mayor preferencia son halo, hidroxilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(arilo), =O, =NOH, =NO(alquilo), -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, azido, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂ y -NHC(=NH)NH₂. En especial, se prefieren fenilo, ciano, halo, hidroxilo, nitro, C₁-C₄alquoxi, O(C₂-C₄ alquilen)OH y O(C₂-C₄ alquilen)halo.

- 35 Cuando la porción que es sustituida es una porción cicloalifática, heterocicloalifática, arilo o heteroarilo, los sustituyentes preferidos son alquilo, alqueno, alquino, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -O(haloalquilo), -O(arilo), -O(cicloalquilo), -O(heterocicloalquilo), alquiltio, ariltio, -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)₂, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, azido, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂, -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO₂(alquilo), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo) y -SO₂N(alquilo)₂. Los sustituyentes de mayor preferencia son alquilo, alqueno, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)₂, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, azido, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo), -NH(hidroxialquilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂, -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(alquilo), -SH, -S(alquilo), -S(arilo), -S(cicloalquilo), -S(=O)alquilo, -SO₂(alquilo), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo) y -SO₂N(alquilo)₂. Los sustituyentes de mayor preferencia son alquilo, alqueno, halo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, ciano, nitro, alcoxi, -O(hidroxialquilo), -C(=O)(alquilo), -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(alquilo), -C(=O)O(hidroxialquilo), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(alquilo), -C(=O)N(alquilo)₂, -OC(=O)(alquilo), -OC(=O)(hidroxialquilo), -OC(=O)O(alquilo), -OC(=O)O(hidroxialquilo), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(alquilo), -OC(=O)N(alquilo)₂, -NH₂, -NH(alquilo), -N(alquilo)₂, -NH(arilo), -NHC(=O)(alquilo), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(alquilo), -NHC(=O)N(alquilo)₂ y -NHC(=NH)NH₂. En especial, se prefieren C₁-C₄ alquilo, ciano, nitro, halo y C₁-C₄alcoxi.

- 50 Cuando se indica un rango, como en "C₁-C₅ alquilo" o "de 5 a 10 %", el rango incluye los extremos del rango, como en C₁ y C₅ en el primer caso, y 5 % y 10 % en el segundo caso.

- 55 A menos que se indiquen específicamente estereoisómeros particulares (por ejemplo, mediante un enlace en negrita o discontinuo en un estereocentro pertinente en una fórmula estructural, mediante la representación de un enlace doble que tiene una configuración E o Z en una fórmula estructural o mediante el uso de nomenclatura que designa la estereoquímica), todos los estereoisómeros están incluidos en el alcance de la invención, como compuestos puros y como sus mezclas. A menos que se indique lo contrario, la presente invención abarca los enantiómeros, diastereómeros e isómeros geométricos individuales, y las combinaciones y mezclas de estos.

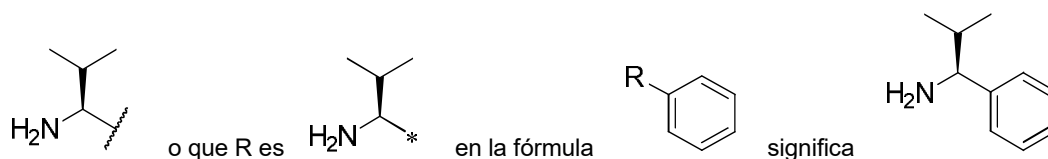
- 60 Las personas del oficio de nivel medio comprenderán que los compuestos pueden tener formas tautoméricas (por ejemplo, formas ceto y enol), formas de resonancia y formas zwitteriónicas que son equivalentes a las representadas en las fórmulas estructurales que se usan en la presente, y que las fórmulas estructurales abarcan esas formas tautoméricas, de resonancia o zwitteriónicas.

- 65 La expresión "éster aceptable desde el punto de vista farmacéutico" significa un éster que se hidroliza *in vivo* (por ejemplo, en el cuerpo humano) para producir el compuesto de origen o una sal de este, o tiene *per se* actividad similar a la del compuesto de origen. Los ésteres adecuados incluyen ésteres de C₁-C₅ alquilo, C₂-C₅ alqueno o C₂-C₅

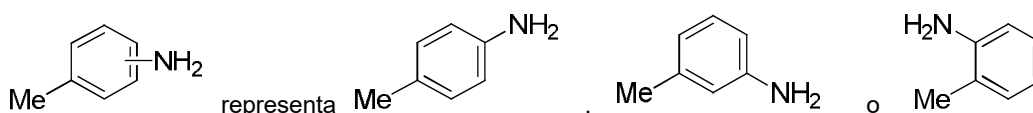
alquinilo, en especial, metilo, etilo o n-propilo.

La expresión "sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico" significa una sal de un compuesto adecuado para la formulación farmacéutica. Cuando un compuesto tiene uno o más grupos básicos, la sal puede ser una sal de adición ácida, tal como sulfato, bromhidrato, tartrato, mesilato, maleato, citrato, fosfato, acetato, pamoato (embonato), yodhidrato, nitrato, clorhidrato, lactato, metilsulfato, fumarato, benzoato, succinato, mesilato, lactobionato, suberato, tosilato y similares. Cuando un compuesto tiene uno o más grupos ácidos, la sal puede ser una sal de calcio, sal de potasio, sal de magnesio, sal de meglumina, sal de amonio, sal de zinc, sal de piperazina, sal de trometamina, sal de litio, sal de colina, sal de dietilamina, sal de 4-fenilciclohexilamina, sal de benzatina, sal de sodio, sal de tetrametilamonio y similares. La presente invención también abarca solvatos y formas cristalinas polimórficas.

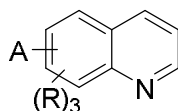
En las fórmulas de la presente memoria descriptiva, una línea ondulada (~~~~~) que atraviesa un enlace o un asterisco (*) en el extremo del enlace indica un sitio de unión covalente. Por ejemplo, una declaración de que R es



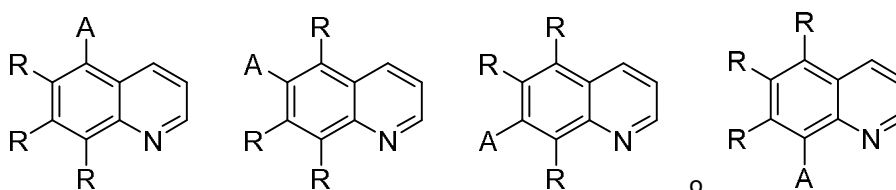
En las fórmulas de la presente memoria descriptiva, un enlace que atraviesa un anillo aromático entre dos carbonos de este significa que el grupo unido al enlace puede estar ubicado en cualquiera de las posiciones del anillo aromático que se volvieron disponibles mediante la eliminación del hidrógeno que está allí implícitamente. A modo ilustrativo, la Fórmula



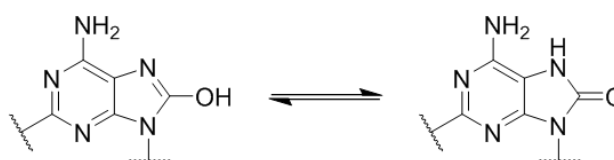
En otra ilustración,



representa



En general, las estructuras tautoméricas se presentaron en la presente en la forma de enol, a los fines de consistencia y conveniencia.



Tautómero enol

Tautómero ceto

Las personas del oficio de nivel medio comprenderán que también se podrían haber presentado en la forma ceto equivalente y que los dos tautómeros son equivalentes.

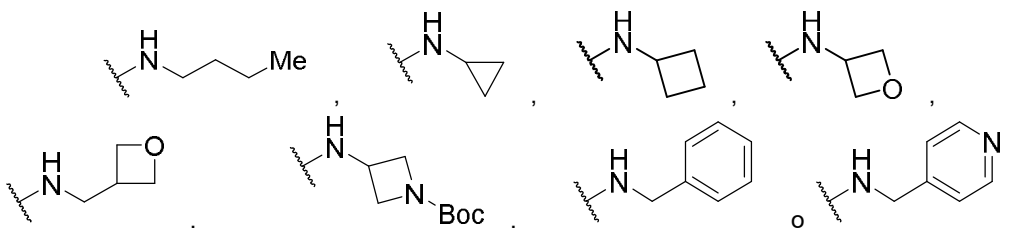
COMPUESTOS

R¹ en la Fórmula (I) es, preferentemente, *n*-BuO, *n*-BuNH, EtO, MeO o MeOCH₂CH₂O; con mayor preferencia, *n*-BuO

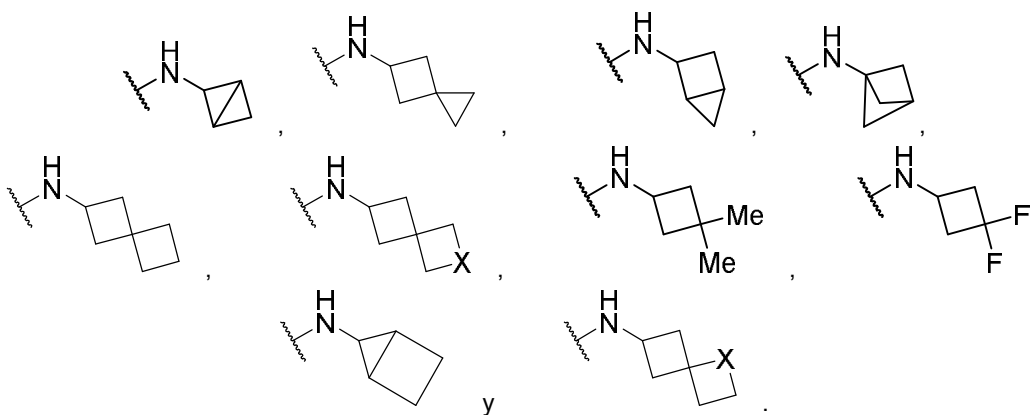
o $\text{MeOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$; y con máxima preferencia, *n*-BuO.

El subíndice *x* de $(\text{CH}_2)_x\text{R}^4$ en la Fórmula (I) es, preferentemente, 2.

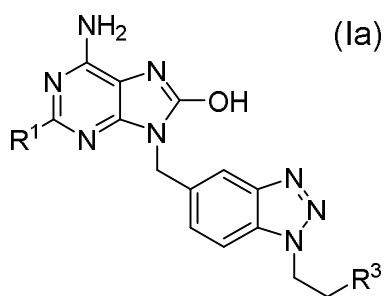
5 En las Fórmulas (I) y (Ia), R^4 es, preferentemente, OH, Cl,



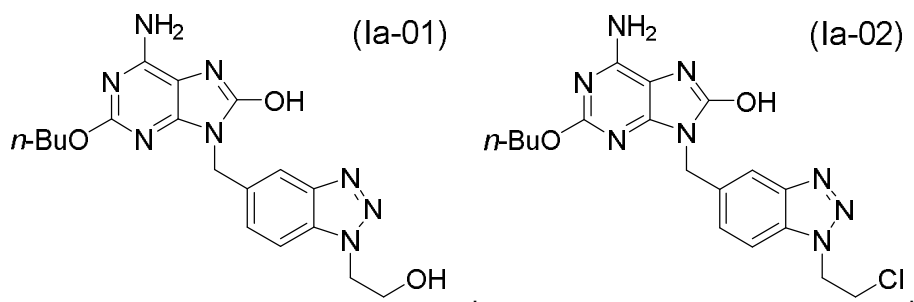
10 Otros ejemplos de grupos R^4 adecuados, que incluyen bicicloalquilo y espirocicloalquilo se muestra a continuación:

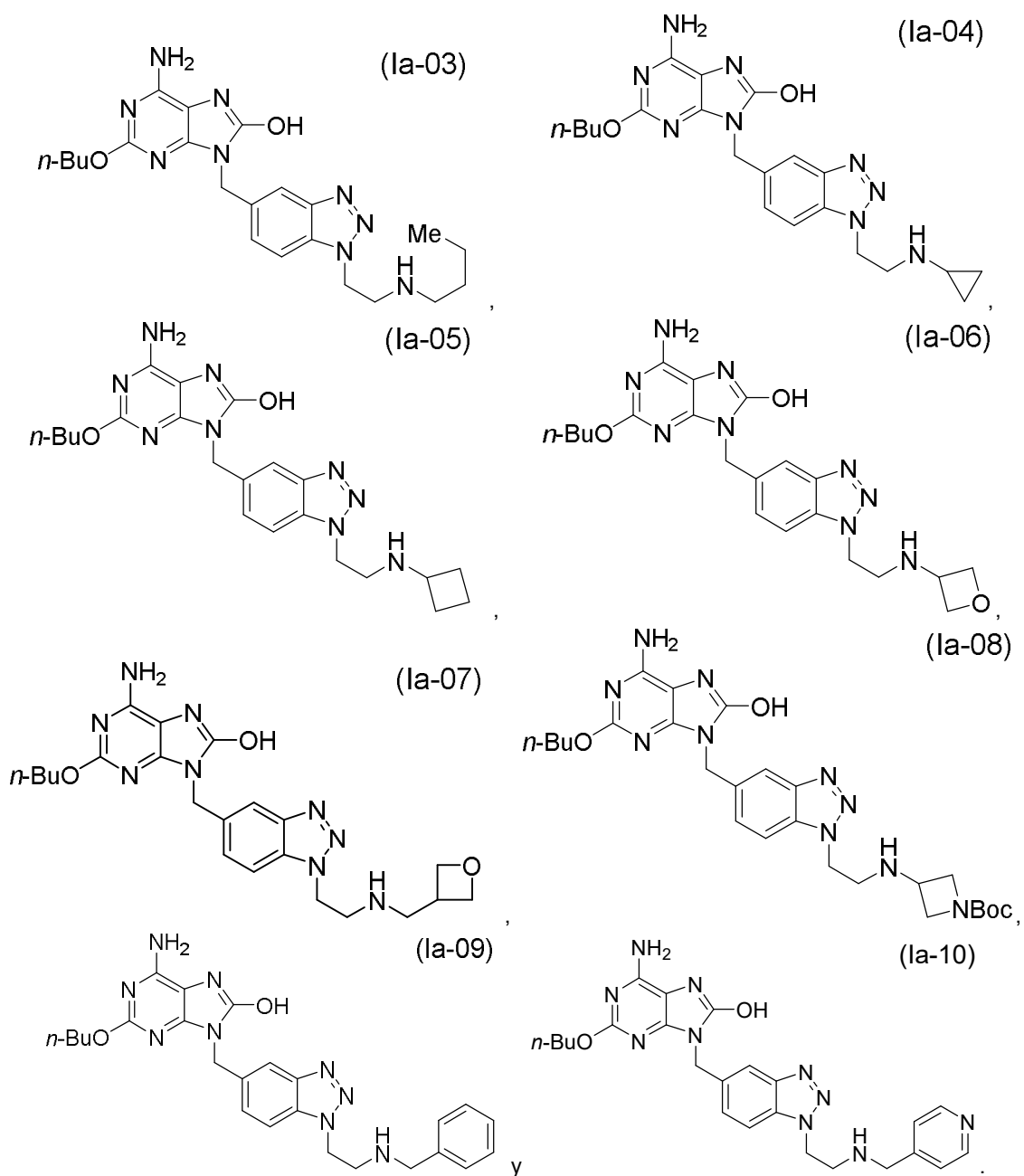


15 En una forma de realización, un compuesto de acuerdo con la Fórmula I está representado por la Fórmula (Ia), en donde R^1 es *n*-BuO o $\text{MeOCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, preferentemente, *n*-BuO:



20 Los ejemplos de compuestos de acuerdo con la Fórmula (Ia) incluyen:





5

La Tabla A presenta datos de la actividad biológica de los compuestos descritos en la presente. Un conjunto de datos se refiere a la actividad agonista de TLR7 usando el ensayo indicador de TLR7 HEK-Blue™, como se describe más adelante en la presente. Otro conjunto de datos se refiere a la inducción de la interleucina 6 (IL-6), una citocina que tiene una función importante en la vía de TLR7. Para fines comparativos, también se presentan las actividades de resiquimod, vesatolimod, gardiquimod y compuesto B (CAS Reg. N.º 226906-84-9).

10

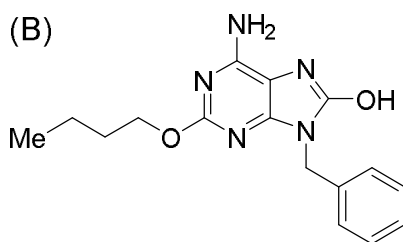


Tabla A – Actividad biológica		
Compuesto	Agonismo de TLR7 (EC ₅₀ , nM)	Inducción de IL-6 (EC ₅₀ , μM)
Resiquimod	420	—
Vesatolimod	1.200	—
Compuesto B	474	—
Ia-01	5,4	0,0370
Ia-02	26	0,0530
Ia-03	2,3	0,0168
Ia-04	4,0	0,0153
Ia-05	0,9	0,0225
Ia-06	11	0,0562
Ia-07	2,4	0,0197
Ia-08	113	—
Ia-09	24	0,0440
Ia-10	7,2	0,0182

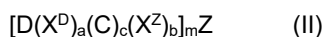
CONJUGADOS

General

Los agonistas de TLR7 descritos en la presente se pueden administrar en el sitio de acción prevista mediante administración localizada o mediante administración dirigida en un conjugado con una porción de direccionamiento. Preferentemente, la porción de direccionamiento es un anticuerpo o una porción de fijación al antígeno de este, y su antígeno se encuentra en el área de acción prevista, por ejemplo, un antígeno asociado al tumor si el sitio de previsto es en un tumor (cáncer). Preferentemente, el antígeno asociado al tumor esta expresado o sobreexpresado únicamente por la célula cancerosa, en comparación con una célula normal. El antígeno asociado al tumor puede estar ubicado en la superficie de la célula cancerosa o ser secretado por la célula cancerosa en sus proximidades.

Otros aspectos de la divulgación incluyen los siguientes.

En un aspecto de la divulgación, se proporciona un conjugado que comprende un compuesto de la presente invención y un ligando, representado por la Fórmula (II)



en donde Z es una porción de direccionamiento, D es un agonista de la presente invención, y $-(X^D)_aC(X^Z)_b-$ se denominan, en forma conjunta, "porción ligadora" o "ligador", porque ligan Z y D. Dentro del ligador, C es un grupo escindible diseñado para escindirse en el sitio de acción biológica previsto de D, o cerca de este; X^D y X^Z son porciones espaciadoras (o "espaciadores") que separan D y C, y C y Z, respectivamente; los subíndices a, b y c son independientemente 0 o 1 (es decir, la presencia de X^D , X^Z y C es opcional). El subíndice m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (preferentemente, 1, 2, 3 o 4). D, X^D , C, X^Z y Z se describen en mayor detalle a continuación.

Al fijarse a un tejido o una célula diana donde se encuentra su antígeno o receptor, Z dirige el conjugado hacia allí. La escisión del grupo C en el tejido o la célula diana libera D para que ejerza su efecto localmente. De esta manera, el suministro preciso de D se logra en el sitio de acción prevista, lo cual reduce la dosificación necesaria. Además, en general, D es biológicamente inactivo (o considerablemente menos activo) en estado conjugado, por lo que se reducen sus efectos diana secundarios.

Como se indica con el subíndice m, cada Z se puede conjugar con más de un D, según la cantidad de sitios que Z tiene disponible para la conjugación y las condiciones experimentales que se usen. Las personas del oficio de nivel medio comprenderán que, si bien cada Z individual se conjuga con un número entero de D, se puede analizar una preparación del conjugado en una relación no de enteros de D con respecto a Z, para así reflejar un promedio estadístico. Esta relación se denomina relación de sustitución ("SR") o relación fármaco-anticuerpo (DAR).

Porción de direccionamiento Z

Preferentemente, la porción de direccionamiento Z es un anticuerpo. Por razones de conveniencia y brevedad, pero no de modo limitativo, la descripción detallada en esta memoria descriptiva sobre Z y sus conjugados se realiza en el contexto de que es un anticuerpo, pero las personas del oficio de nivel medio comprenderán que se pueden conjugar otros tipos de Z, *mutatis mutandis*. Por ejemplo, los conjugados con ácido fólico como la porción de direccionamiento se pueden dirigir a células que tienen el receptor de folato en sus superficies (Leamon *et al.*, Cancer Res. **2008**, 68 (23), 9839). Por las mismas razones, la siguiente descripción detallada en esta memoria descriptiva se realiza en términos de una relación 1:1 de Z con respecto a D (m = 1).

Los anticuerpos que se pueden usar en los conjugados de la presente invención incluyen aquellos que reconocen los

siguientes antígenos: mesotelina, antígeno membranar específico de la próstata (PSMA), CD19, CD22, CD30, CD70, B7H3, B7H4 (también conocido como O8E), proteína tirosina quinasa 7 (PTK7), glipicano-3, RG1, fucosil-GM1, CTLA-4 y CD44. El anticuerpo puede ser animal (por ejemplo, murino), quimérico, humanizado o, preferentemente, humano. Preferentemente, el anticuerpo es monoclonal, en especial, es un anticuerpo monoclonal humano. La preparación de anticuerpos monoclonales humanos contra algunos de los antígenos mencionados anteriormente se describe en Korman *et al.*, US 8.609.816 B2 (2013; B7H4, también conocido como O8E; en particular, anticuerpos 2A7, 1G11 y 2F9); Rao-Naik *et al.*, 8.097.703 B2 (2012; CD19; en particular, anticuerpos 5G7, 13F1, 46E8, 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3 y 3C10); King *et al.*, US 8.481.683 B2 (2013; CD22; en particular, anticuerpos 12C5, 19A3, 16F7 y 23C6); Keler *et al.*, US 7.387.776 B2 (2008; CD30; en particular, anticuerpos 5F11, 2H9 y 17G1); Terrett *et al.*, US 8.124.738 B2 (2012; CD70; en particular, anticuerpos 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 y 69A7); Korman *et al.*, US 6.984.720 B1 (2006; CTLA-4; en particular, anticuerpos 10D1, 4B6 y 1E2); Korman *et al.*, US 8.008.449 B2 (2011; PD-1; en particular, anticuerpos 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 y 5F4); Huang *et al.*, US 2009/0297438 A1 (2009; PSMA, en particular, anticuerpos 1C3, 2A10, 2F5, 2C6); Cardarelli *et al.*, US 7.875.278 B2 (2011; PSMA; en particular, anticuerpos 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3); Terrett *et al.*, US 8.222.375 B2 (2012; PTK7; en particular, anticuerpos 3G8, 4D5, 12C6, 12C6a y 7C8); Harkins *et al.*, US 7.335.748 B2 (2008; RG1; en particular, anticuerpos A, B, C y D); Terrett *et al.*, US 8.268.970 B2 (2012; mesotelina; en particular, anticuerpos 3C10, 6A4 y 7B1); Xu *et al.*, US 2010/0092484 A1 (2010; CD44; en particular, anticuerpos 14G9.B8.B4, 2D1.A3.D12 y 1A9.A6.B9); Deshpande *et al.*, US 8.258.266 B2 (2012; IP10; en particular, anticuerpos 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S y 13C4); Kuhne *et al.*, US 8.450.464 B2 (2013; CXCR4; en particular, anticuerpos F7, F9, D1 y E2); y Korman *et al.*, US 7.943.743 B2 (2011; PD-L1; en particular, anticuerpos 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 y 13G4). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo antimesotelina.

Además de ser un anticuerpo, Z también puede ser un fragmento de anticuerpo (tal como Fab, Fab', F(ab')₂, Fd o Fv) o mimético del anticuerpo, tal como Affibody, anticuerpo de dominio (dAb), nanocuerpo, unicuerpo, DARPin, Anticalin, Versabody, Duocalin, lipocalina o avímero.

Cualquiera de los varios grupos reactivos diferentes en Z puede ser un sitio de conjugación, que incluyen grupos ε-amino en los residuos de lisina, porciones de hidratos de carbono colgantes, grupos de ácidos carboxílicos en cadenas laterales de ácido aspártico o glutámico, grupos disulfuro cisteína-cisteína y grupos tiol cisteína. Para obtener reseñas sobre grupos reactivos de anticuerpos adecuados para la conjugación, véanse, por ejemplo, Garnett, *Adv. Drug Delivery Rev.* 2001, 53, 171-216 y Dubowchik and Walker, *Pharmacology & Therapeutics* 1999, 83, 67-123.

La mayoría de los anticuerpos tienen múltiples residuos de lisina, que se pueden conjugar a través de sus grupos ε-amino mediante enlaces de amida, urea, tiourea o carbamato.

Un grupo tiol (-SH) en la cadena lateral de una cisteína se puede usar para formar un conjugado mediante varios métodos. Se puede usar para formar un puente disulfuro entre este y un grupo tiol en el ligador. Otro método es mediante su adición de Michael a un grupo maleimida en el ligador.

Por lo general, a pesar de que los anticuerpos tienen residuos de cisteína, carecen de grupos tiol libres ya que todas sus cisteínas están unidas en puentes disulfuro intra- o intercadena. Para generar un grupo tiol libre, se puede reducir un grupo disulfuro nativo. Véase, por ejemplo, Packard *et al.*, *Biochemistry* 1986, 25, 3548; King *et al.*, *Cancer Res.* 1994, 54, 6176; y Doronina *et al.*, *Nature Biotechnol.* 2003, 21, 778. De manera alternativa, una cisteína que tiene un grupo -SH libre se puede introducir mutando el anticuerpo, sustituyendo una cisteína con otro aminoácido o insertando uno en la cadena de polipéptidos. Véanse, por ejemplo, Eigenbrot *et al.*, US 7.521.541 B2 (2009); Chilkoti *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 1994, 5, 504; Urovitz *et al.*, US 4.698.420 (1987); Stimmel *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 30445; Bam *et al.*, US 7.311.902 B2 (2007); Kuan *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 7610; Poon *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 8571; Junutula *et al.*, *Nature Biotechnology* 2008, 26, 925 y Rajpal *et al.*, solicitud provisional estadounidense N.º 62/270245, presentada el 21 de diciembre de 2015. Aun en otro enfoque, una cisteína se agrega al terminal C de las cadenas pesada o liviana. Véanse, por ejemplo, Liu *et al.*, US 8.865.875 B2 (2014); Cumber *et al.*, *J. Immunol.* 1992, 149, 120; King *et al.*, *Cancer Res.* 1994, 54, 6176; Li *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 2002, 13, 985; Yang *et al.*, *Protein Engineering* 2003, 16, 761; y Olafson *et al.*, *Protein Engineering Design & Selection* 2004, 17, 21.

Ligadores y sus componentes

Como se indicó anteriormente, el ligador comprende hasta 3 elementos: un grupo escindible C y espaciadores opcionales X² y X^D.

El grupo C es escindible en condiciones fisiológicas. Preferentemente, es relativamente estable mientras el conjugado está en circulación en la sangre, pero es fácilmente escindible una vez que el conjugado alcanza su sitio de acción prevista.

Un grupo C preferido es un péptido que se escinde de manera selectiva por una proteasa dentro de la célula diana, en contraposición a una proteasa en el suero. Con frecuencia, el péptido comprende de 1 a 20 aminoácidos, preferentemente, de 1 a 6 aminoácidos, con mayor preferencia, de 2 a 3 aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser α-aminoácidos naturales y/o no naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético,

así como los aminoácidos derivados de ellos, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, citrulina y O-fosfoserina. En esta memoria descriptiva, el término "aminoácido" también incluye análogos y miméticos de aminoácidos. Los análogos son compuestos que tienen la misma estructura $H_2N(R)CHCO_2H$ general de un aminoácido natural, excepto que el grupo R no se encuentra en los aminoácidos naturales. Los ejemplos de análogos incluyen homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina y metionina metil sulfonio. Un aminoácido mimético es un compuesto que tiene una estructura diferente de la estructura química general de un α -aminoácido, pero funciona de manera similar a aquel. El aminoácido puede ser de estereoquímica "L" de los aminoácidos genéticamente codificados, así como de estereoquímica "D" enantiomérica.

Preferentemente, C contiene una secuencia de aminoácidos que es una secuencia de reconocimiento de escisión de una proteasa. En el estado de la técnica, se conocen diversas secuencias de reconocimiento de escisión. Véanse, por ejemplo, Matayoshi et al. *Science* 247: 954 (1990); Dunn et al. *Meth. Enzymol.* 241: 254 (1994); Seidah et al. *Meth. Enzymol.* 244: 175 (1994); Thornberry, *Meth. Enzymol.* 244: 615 (1994); Weber et al. *Meth. Enzymol.* 244: 595 (1994); Smith et al. *Meth. Enzymol.* 244: 412 (1994); y Bouvier et al. *Meth. Enzymol.* 248: 614 (1995).

Un grupo C de forma tal que sea escindido por una proteasa presente en la matriz extracelular cerca de un tipo de cáncer, por ejemplo, una proteasa liberada por células cancerosas moribundas cercanas o una proteasa asociada al tumor secretada por células cancerosas. Los ejemplos de proteasas extracelulares asociadas a un tumor son plasmína, metaloproteasas de matriz (MMP), thimet oligopeptidasa (TOP) y CD10. Véanse, por ejemplo, Trouet et al., US 7.402.556 B2 (2008); Dubois et al., US 7.425.541 B2 (2008); y Bebbington et al., US 6.897.034 B2 (2005). La cathepsina D, generalmente una enzima lisosomal que se encuentra dentro de las células, se encuentra a veces en las proximidades de un tumor, posiblemente liberada por células cancerosas moribundas.

Para conjugados diseñados para ser [omisión en el texto fuente] por una enzima, C comprende, preferentemente, una secuencia de aminoácidos seleccionada para la escisión mediante proteasas tales como cathepsinas B, C, D, H, L y S, en especial, cathepsina B. Los ejemplos de péptidos escindibles mediante cathepsina B incluyen Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Lys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, Val-Ala, Lys-Val-Cit, Ala-Val-Cit, Val-Gly, Val-Gln y Asp-Val-Cit. (En la presente, las secuencias de aminoácidos se escriben en la dirección N a C, como en $H_2N-AA^2-AA^1-CO_2H$, a menos que el contexto indique claramente lo contrario). Véanse Dubowchik et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8, 3341; Dubowchik et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8, 3347; y Dubowchik et al., *Bioconjugate Chem.* 2002, 13, 855.

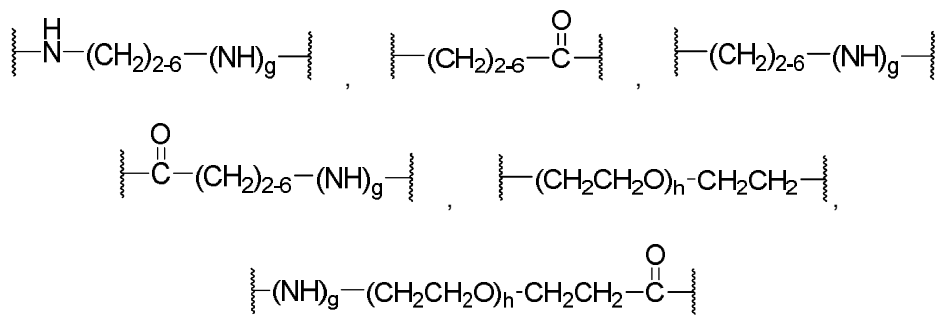
Otra enzima que se puede utilizar para la escisión de ligadores de peptídico es legumaina, una cisteína proteasa lisosómica que se escinde, preferentemente, en Ala-Ala-Asn.

En un aspecto de la divulgación, el grupo C es un péptido que comprende una secuencia de dos aminoácidos $-AA^2-AA^1-$, en donde AA^1 es lisina, arginina o citrulina, y AA^2 es fenilalanina, valina, alanina, leucina o isoleucina. En otro aspecto, C consiste de una secuencia de 1 a 3 aminoácidos, seleccionados del grupo que consiste en Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Ala-Asn, Lys, Cit, Ser y Glu. Con mayor preferencia, es un péptido de 2 a 3 aminoácidos del grupo anterior.

La preparación y el diseño de grupos escindibles C que consisten en un solo aminoácido se describen en Chen et al., US 8.664.407 B2 (2014).

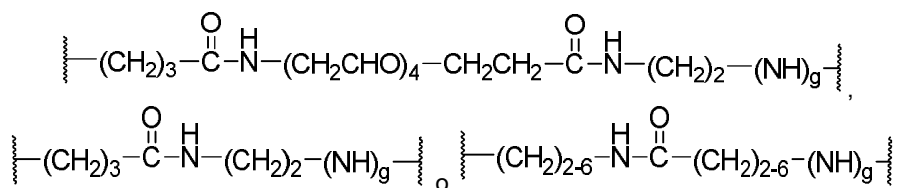
El grupo C se puede unir directamente a Z o D; es decir, los espaciadores X^Z o X^D , según el caso, pueden estar ausentes.

Cuando está presente, el espaciador X^Z proporciona una separación espacial entre C y Z, para que el primero interfiera en forma estérica en la fijación al antígeno por parte del último o que el último interfiera en forma estérica en la escisión del primero. Además, el espaciador X^Z se puede usar para conferir mayor solubilidad o menores propiedades de agregación a los conjugados. Un espaciador X^Z puede comprender uno o más segmentos modulares, que se pueden ensamblar mediante diversas combinaciones. Los ejemplos de segmentos adecuados para un espaciador X^Z son:



y combinaciones de estos, en donde el subíndice g es 0 o 1, y el subíndice h es 1 a 24, preferentemente, 2 a 4. Estos

segmentos se pueden combinar, como se ilustra a continuación:



5

El espaciador X^D , si está presente, proporciona una separación espacial entre C y D, para que el último interfiera en forma estérica o electrónica en la escisión del primero. El espaciador X^D también puede cumplir con la función de introducir masa molecular y funcionalidad química adicionales en un conjugado. En general, la masa y la funcionalidad adicionales afectarán la semivida del suero y otras propiedades del conjugado. Por ende, a través de la selección prudente de grupos espaciadores, la semivida del suero de un conjugado se puede modular. El espaciador X^D también se puede ensamblar de segmentos modulares, de manera análoga a la descripción anterior del espaciador X^Z .

10

Los espaciadores X^Z y/o X^D , cuando están presentes, proporcionan preferentemente una separación lineal de 4 a 25 átomos, con mayor preferencia, de 4 a 20 átomos, entre Z y C o D y C, respectivamente.

15

El ligador puede cumplir otras funciones además de ligar de manera covalente el anticuerpo y el fármaco. Por ejemplo, el ligador puede contener un grupo poli(etilenglicol) ("PEG"). Dado que la etapa de conjugación habitualmente implica el acoplamiento de un fármaco-ligador con un anticuerpo en un medio acuoso, un grupo PEG puede mejorar la solubilidad acuosa del fármaco-ligador. Asimismo, un grupo PEG puede mejorar la solubilidad o reducir la agregación en el ADC resultante. Cuando un grupo PEG está presente, se puede incorporar en cualquiera de los espaciadores X^Z o X^D , o en ambos. La cantidad de unidades de repetición en un grupo PEG puede ser de 2 a 20, preferentemente, entre 4 y 10.

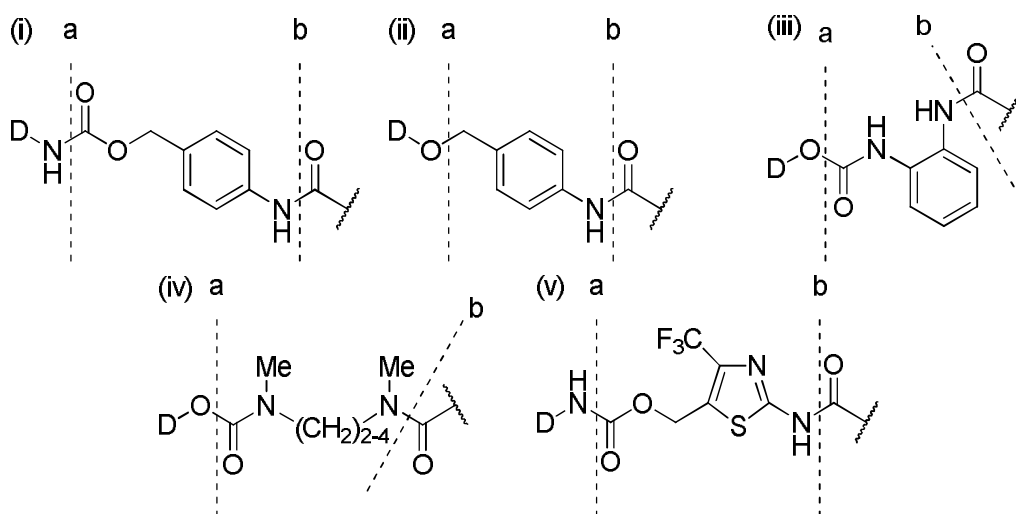
20

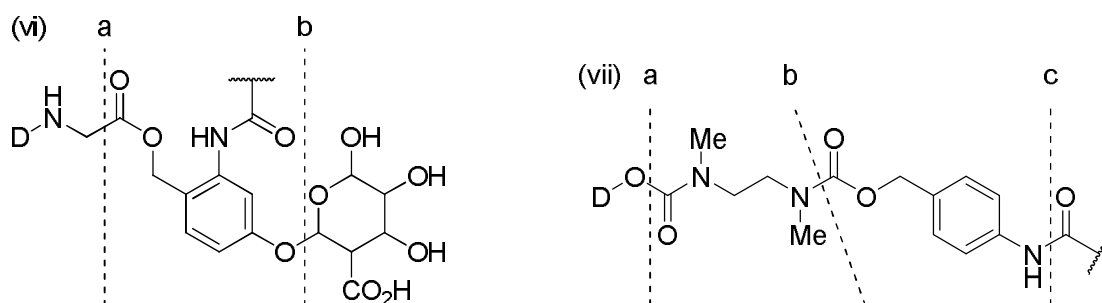
Cualquier espaciador X^Z o X^D , o ambos, pueden comprender una porción que se autoinmola. Una porción que se autoinmola es una porción que (1) se fija a C y a Z o D y (2) tiene una estructura tal que la escisión del grupo C inicia una secuencia de reacción que da como resultado que la porción que se autoinmola se desprende de Z o D, según el caso. En otras palabras, la reacción en sitio distal de Z o D (escisión del grupo C) también provoca la ruptura del enlace $X^Z\text{---}Z$ o $X^D\text{---}D$. La presencia de una porción que se autoinmola es conveniente en el caso del espaciador X^D porque, si después de la escisión del conjugado, el espaciador X^D o una porción de este permanecen fijos a D, la actividad biológica de D puede verse perjudicada. El uso de una porción que se autoinmola es específicamente conveniente cuando el grupo escindible C es un polipéptido, en cuyo caso, la porción que se autoinmola se ubica, por lo general, de manera adyacente a este, con el fin de evitar que D interfiera en forma estérica o electrónica en la escisión peptídica.

30

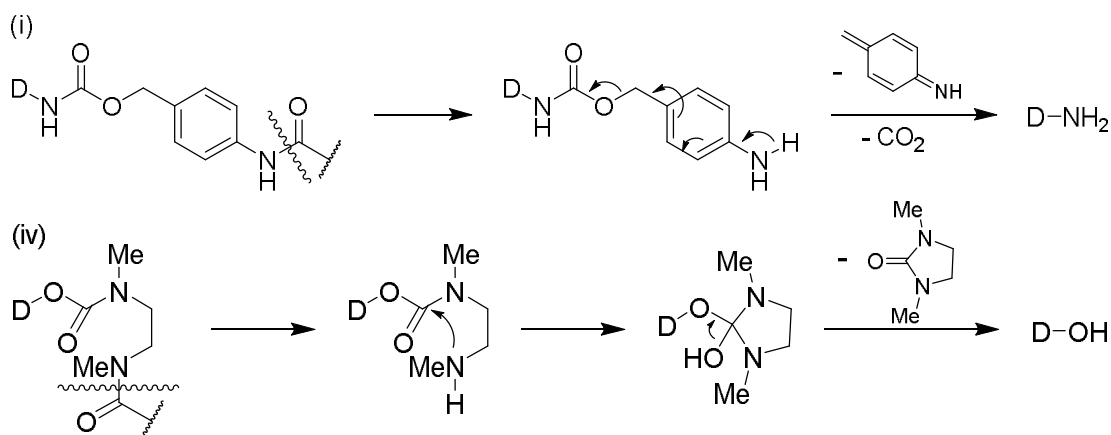
Los ejemplos de porciones que se autoinmolan (i)-(v) unidas a un grupo hidroxilo o amino de D se muestran a continuación:

35





La porción que se autoinmola es la estructura entre las líneas punteadas a y b (o líneas punteadas b y c); se muestran características estructurales para proporcionar contexto. Las porciones que se autoinmolan (i) y (v) se fijan a un D-NH₂ (es decir, la conjugación es a través de un grupo amino), mientras que las porciones que se autoinmolan (ii), (iii) y (iv) se fijan a un D-OH (es decir, la conjugación es a través de un grupo hidroxilo o carboxilo). La escisión del enlace en la línea punteada b mediante una enzima – una peptidasa en el caso de las estructuras (i)-(v) y una β-glucuronidasa en el caso de la estructura (vi) – inicia una secuencia de reacción que se autoinmola que da como resultado la escisión del enlace en la línea punteada a y la liberación resultante de D-OH o D-NH₂, según el caso. A modo ilustrativo, los mecanismos de autoinmolación para estructuras (i) y (iv) se muestran a continuación:



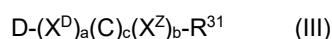
En otras palabras, la escisión de un primer enlace químico en una parte de un grupo que se autoinmola inicia una secuencia de etapas que da como resultado la escisión de un segundo enlace químico – el que conecta el grupo que se autoinmola al fármaco – en una parte diferente del grupo que se autoinmola, y así libera el fármaco.

En algunos casos, los grupos que se autoinmolan se pueden usar en tándem, como se muestra en la estructura (vii). En este caso, la escisión en la línea punteada c desencadena la autoinmolación de la porción entre las líneas punteadas b y c mediante una reacción de eliminación 1,6, seguida de la autoinmolación de la porción entre las líneas punteadas a y b mediante una reacción de ciclización-eliminación. Para obtener descripciones adicionales con respecto a porciones que se autoinmolan, véase Carl *et al.*, *J. Med. Chem.* 1981, 24, 479; Carl *et al.*, WO 81/01145 (1981); Dubowchik *et al.*, *Pharmacology & Therapeutics* 1999, 83, 67; Firestone *et al.*, US 6.214.345 B1 (2001); Toki *et al.*, *J. Org. Chem.* 2002, 67, 1866; Doronina *et al.*, *Nature Biotechnology* 2003, 21, 778 (erratum, p. 941); Boyd *et al.*, US 7.691.962 B2; Boyd *et al.*, US 2008/0279868 A1; Sufi *et al.*, WO 2008/083312 A2; Feng, US 7.375.078 B2; Jeffrey *et al.*, US 8.039.273; y Senter *et al.*, US 2003/0096743 A1.

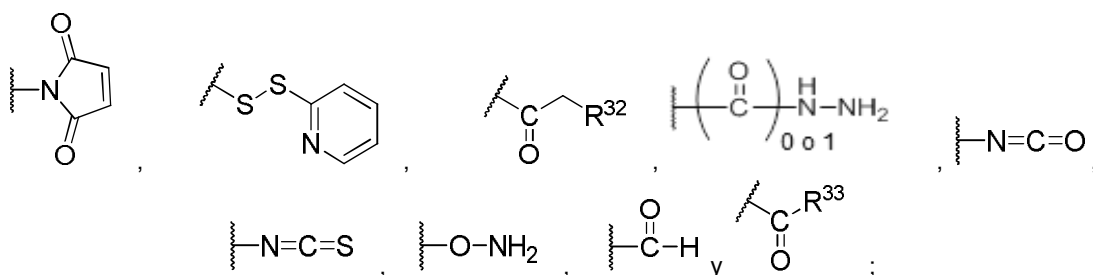
En otro caso, Z y D están ligados por un ligador no escindible, es decir, C está ausente. El metabolismo de D eventualmente reduce el ligador a una pequeña porción unida que no interfiere en la actividad biológica de D.

Técnicas de conjugación

Los conjugados de los agonistas de TLR7 descritos en la presente se realizan preferentemente al preparar primero un compuesto que comprende D y un ligador (X^D)_a(C)_c(X^Z)_b (en donde X^D, C, X^Z, a, b y c son como se definen en la Fórmula (II)) para formar un compuesto fármaco-ligador representado por la Fórmula (III):

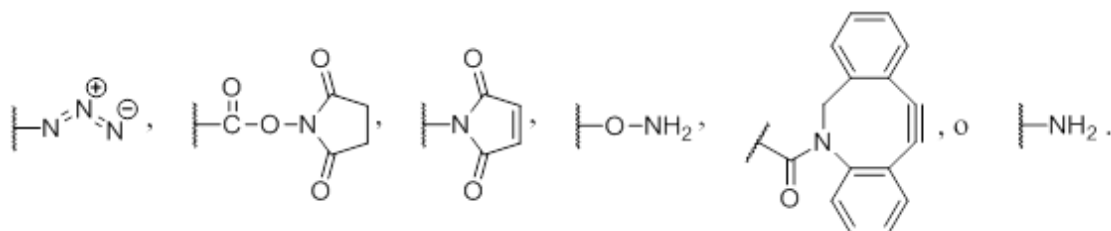


en donde R³¹ es un grupo funcional adecuado para reaccionar con un grupo funcional complementario en Z para formar el conjugado. Los ejemplos de grupos R³¹ adecuados incluyen amino, azida, tiol, ciclooctino,



en donde R^{32} es Cl, Br, F, mesilato o tosilato, y R^{33} es Cl, Br, I, F, OH, -O-N-succinimidilo, -O-(4-nitrofenilo), -O-pentafluorofenilo, o -O-tetrafluorofenilo. La química que generalmente se puede usar para la preparación de porciones adecuadas $\text{D}-(\text{X}^0)_a\text{C}(\text{X}^Z)_b-\text{R}^{31}$ se describe en Ng *et al.*, US 7.087.600 B2 (2006); Ng *et al.*, US 6.989.452 B2 (2006); Ng *et al.*, US 7.129.261 B2 (2006); Ng *et al.*, WO 02/096910 A1; Boyd *et al.*, US 7,691,962 B2; Chen *et al.*, US 7,517,903 B2 (2009); Gangwar *et al.*, US 7,714,016 B2 (2010); Boyd *et al.*, US 2008/0279868 A1; Gangwar *et al.*, US 7,847,105 B2 (2010); Gangwar *et al.*, US 7,968,586 B2 (2011); Sufi *et al.*, US 8,461,117 B2 (2013); y Chen *et al.*, US 8,664,407 B2 (2014).

Preferentemente, el grupo funcional reactivo $-\text{R}^{31}$ es $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SH}$, maleimido, ciclooctino, azido ($-\text{N}_3$), hidroxilamino ($-\text{ONH}_2$) o N-hidroxisuccinimido. Los grupos funcionales $-\text{R}^{31}$ de especial preferencia son los siguientes:



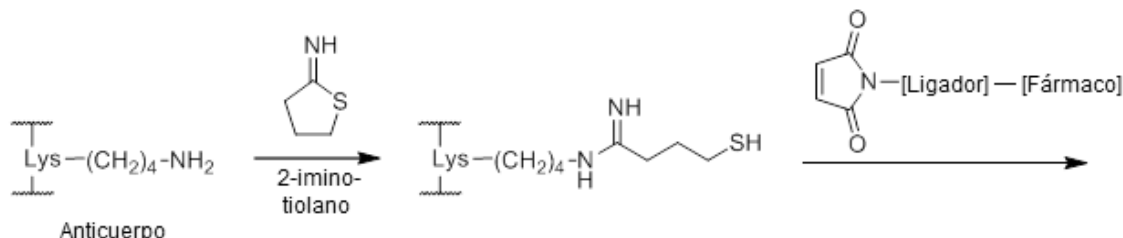
Un grupo $-\text{OH}$ se puede esterificar con un grupo carboxi en el anticuerpo, por ejemplo, en una cadena lateral de ácido aspártico o glutámico.

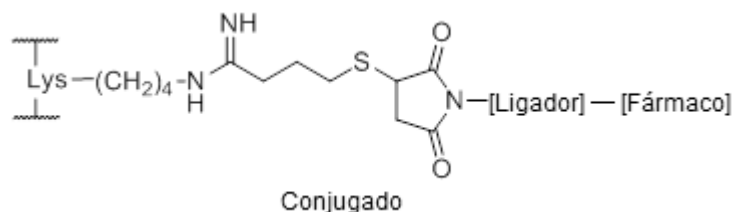
Un grupo $-\text{CO}_2\text{H}$ se puede esterificar con un grupo $-\text{OH}$ o se puede amidar con un grupo amino (por ejemplo, en una cadena lateral de lisina) en el anticuerpo.

Un grupo N-hidroxisuccinimida es, funcionalmente, un grupo carboxilo activado y se puede amidar, en forma conveniente, mediante la reacción con un grupo amino (por ejemplo, de lisina).

Un grupo maleimida se puede conjugar con un grupo $-\text{SH}$ en el anticuerpo (por ejemplo, de cisteína o de la modificación química del anticuerpo para introducir una funcionalidad de sulfhidrilo), en una reacción de adición de Michael.

Cuando un anticuerpo no tiene una cisteína $-\text{SH}$ disponible para la conjugación, un grupo ϵ -amino en la cadena lateral de un residuo de lisina se puede hacer reaccionar con 2-iminotiolano o N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato ("SPDP") para introducir un grupo tiol ($-\text{SH}$) libre – y así se crea un sustituto de cisteína, por así decirlo. El grupo tiol se puede hacer reaccionar con una maleimida u otro grupo aceptor nucleófilo para producir la conjugación. El mecanismo se ilustra a continuación con 2-iminotiolano.

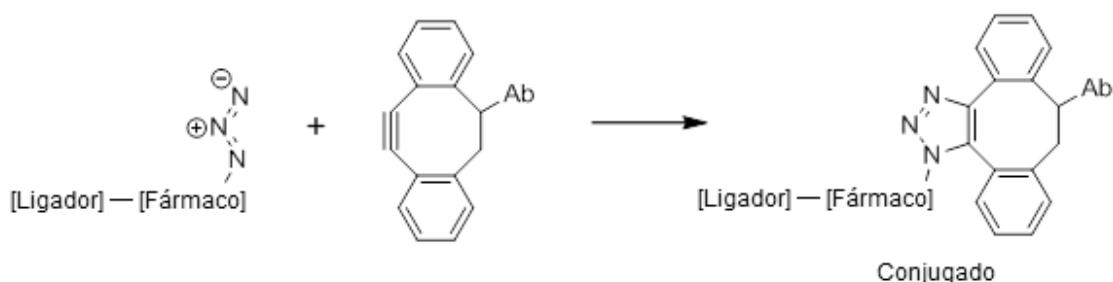




En general, se logra un nivel de tiolación de dos o tres tioles por anticuerpo. Para un procedimiento representativo, véase Cong *et al.*, US 8.980.824 B2 (2015).

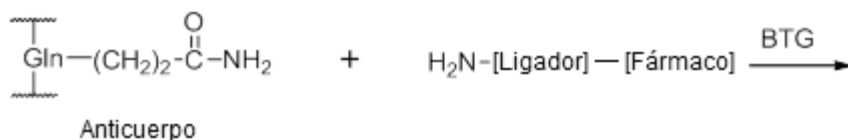
En una disposición inversa, un anticuerpo Z se puede modificar con N-succinimidil 4-(maleimidometil)-ciclohexancarboxilato ("SMCC") o su variante sulfonada sulfo-SMCC, ambas disponibles de Sigma-Aldrich, para introducir un grupo de maleimida en este. Luego, la conjugación se puede realizar con un compuesto fármaco-ligador que tiene un grupo -SH en el ligador.

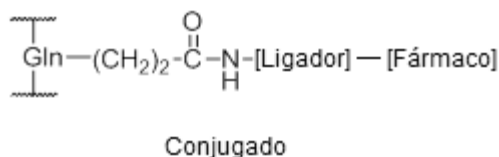
Un método de conjugación alternativa utiliza "química clic" libre de cobre, en donde un grupo azida agrega en ciclooctino con tensión anular para formar un anillo de 1,2,3-triazol. Véase, por ejemplo, Agard *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 2004, 126, 15046; Best, *Biochemistry* 2009, 48, 6571. La azida se puede ubicar en el anticuerpo, y el ciclooctino, en la porción fármaco-ligador, o viceversa. Un grupo ciclooctino preferido es dibenzociclooctino (DIBO). Diversos reactivos que tienen un grupo DIBO se encuentran disponibles de Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, Oregon. La siguiente reacción ilustra la conjugación por química clic para el caso en donde el grupo DIBO está unido al anticuerpo (Ab):



Incluso otra técnica de conjugación incluye introducir un aminoácido no natural en un anticuerpo, en donde el aminoácido no natural proporciona una funcionalidad para la conjugación con un grupo funcional reactivo en la porción fármaco. Por ejemplo, la p-acetilfenilalanina de aminoácidos no natural se puede incorporar en un anticuerpo u otro polipéptido, como se indica en Tian *et al.*, WO 2008/030612 A2 (2008). El grupo cetona en la p-acetilfenilalanina puede ser un sitio de conjugación mediante la formación de una oxima con un grupo hidroxilamino en la porción ligador-fármaco. De manera alternativa, el aminoácido no natural p-azidofenilalanina se puede incorporar en un anticuerpo para proporcionar un grupo funcional azida para la conjugación mediante química clic, como se analizó anteriormente. Los aminoácidos no naturales también se pueden incorporar en un anticuerpo u otro polipéptido usando métodos libres de células, como se indica en Goerke *et al.*, US 2010/0093024 A1 (2010) y Goerke *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 2009, 102 (2), 400-416. Por lo tanto, un anticuerpo que se usa para preparar un conjugado puede tener uno o más aminoácidos reemplazados por un aminoácido no natural, que, preferentemente, es p-acetilfenilalanina o p-azidofenilalanina, con mayor preferencia, p-acetilfenilalanina.

Otra técnica de conjugación usa la enzima transglutaminasa (preferentemente, transglutaminasa bacteriana de *Streptomyces mobaraensis* o BTG), por Jeger *et al.*, *Angew. Chem. ed. int.* 2010, 49, 9995. La BTG forma un enlace de amida entre la carboxamida de la cadena lateral de una glutamina (el aceptor de amina) y un grupo alquilenamino (el donante de amina), que puede ser, por ejemplo, el grupo ε-amino de una lisina o un grupo 5-amino-n-pentilo. En una reacción de conjugación típica, el residuo de glutamina se ubica en el anticuerpo, mientras que el grupo alquilenamino se ubica en la porción ligador-fármaco, como se muestra a continuación:





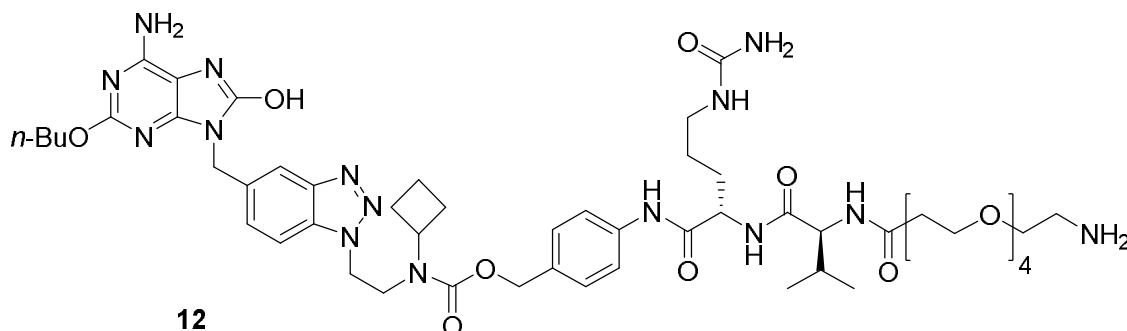
La posición de un residuo de glutamina en una cadena de polipéptidos tiene un efecto importante en su susceptibilidad a la transamidación mediada por BTG. Ninguno de los residuos de glutamina en un anticuerpo son normalmente sustratos de BTG. Sin embargo, si el anticuerpo se desglucosila – el sitio de glucosilación es asparagina 297 (N297; (numeración de acuerdo con el índice EU, según se establece en Kabat et al., "Sequences of proteins of immunological interest", 5.^a ed., Pub. N.º 91-3242, U.S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, Md., 1991; en adelante "Kabat") de la cadena pesada – la glutamina 295 (Q295) cercana se vuelve susceptible a BTG. Un anticuerpo se puede desglucosilar enzimáticamente mediante el tratamiento con PNGasa F (Péptido-N-Glucosidasa F). De manera alternativa, un anticuerpo se puede sintetizar libre de glucósido introduciendo una mutación N297A en la región constante para eliminar el sitio de glucosilación N297. Además, se demostró que una sustitución N297Q no solo elimina la glucosilación, sino que también introduce un segundo residuo de glutamina (en la posición 297) que también es un aceptor de amina. Por ende, el anticuerpo se puede desglucosilar. En otro caso, el anticuerpo puede tener una sustitución N297Q. Las personas del oficio de nivel medio comprenderán que la desglucosilación mediante modificación posterior a la síntesis o mediante la introducción de una mutación N297A genera dos residuos de glutamina que reaccionan a BTG por anticuerpo (uno por cadena pesada, en la posición 295), mientras que un anticuerpo con una sustitución N297Q tendrá cuatro residuos de glutamina que reaccionan a BTG (dos por cadena pesada, en las posiciones 295 y 297).

Un anticuerpo también se puede volver susceptible a una conjugación mediada por BTG al introducir en este una glutamina que contiene péptido, o "etiqueta", como se enseña, por ejemplo, en Pons *et al.*, US 2013/0230543 A1 (2013) y Rao-Naik *et al.*, WO 2016/144608 A1.

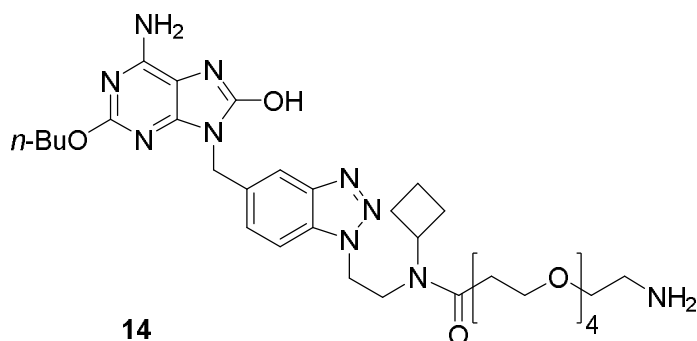
En un enfoque complementario, la especificidad del sustrato de BTG se puede alterar al variar su secuencia de aminoácidos, de manera que se vuelva capaz de reaccionar con glutamina 295 en un anticuerpo no modificado, como se enseña en Rao-Naik *et al.*, WO 2017/059158 A1 (2017).

Si bien la transglutaminasa bacteriana más comúnmente disponible es la de *S. mobaraensis*, se puede considerar la transglutaminasa de otras bacterias, que tienen especificidades de sustrato un poco diferentes, tal como transglutaminasa de *Streptovorticillium ladakanum* (Hu *et al.*, US 2009/0318349 A1 (2009), US 2010/0099610 A1 (2010) y US 2010/0087371 A1 (2010)).

Los agonistas de la invención que tienen una amina alquilo primaria o secundaria son particularmente adecuadas para usar en conjugados, debido a que la amina proporciona un grupo funcional para la unión del ligador. Un ejemplo de este tipo de compuesto agonista de TLR7-ligador es el compuesto **12**, que contiene un ligador que se puede escindir en forma enzimática. La **Figura 2** muestra un esquema de acuerdo con el que se puede preparar dicho compuesto **12**.



Un ejemplo de un compuesto agonista de TLR7-ligador que contiene un ligador que no se puede escindir en forma enzimática es el compuesto **14**. La **Figura 3** muestra un esquema para sintetizar el compuesto **14**.

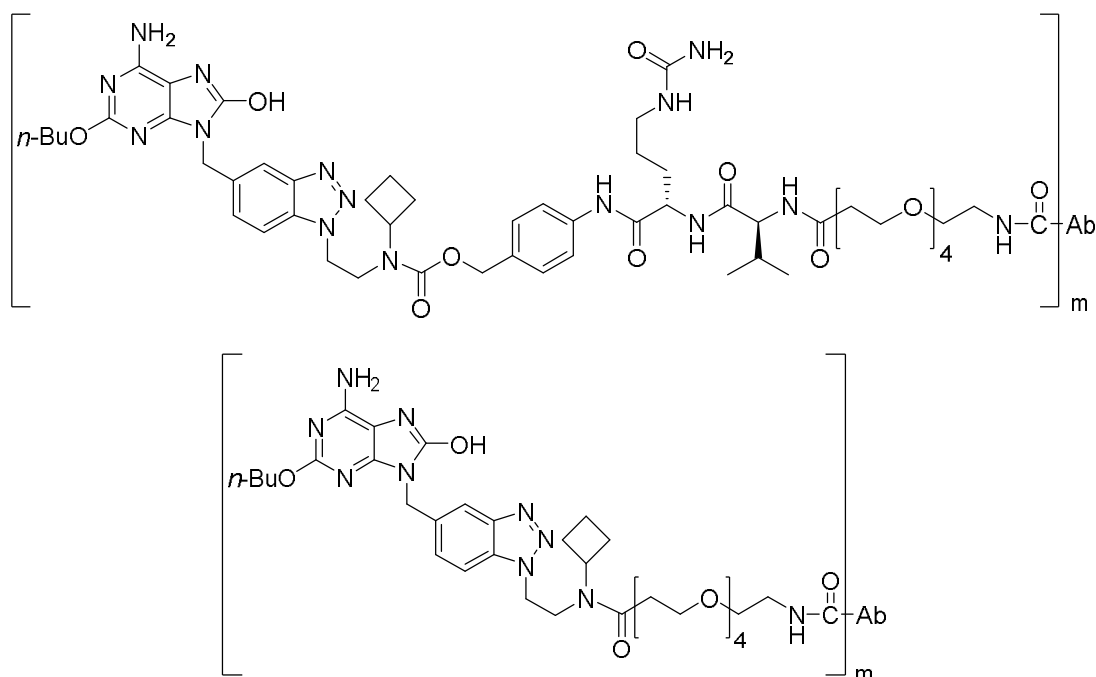


Ambos compuestos **12** y **14** contienen un grupo alquilamino primario, que los vuelve susceptibles a la conjugación con transglutaminasa. Un proceso de conjugación adecuado se describe en los Ejemplos más adelante.

La conjugación también puede llevarse a cabo usando la enzima Sortasa A, como se explica en Levary *et al.*, *PLoS One* **2011**, 6(4), e18342; Proft, *Biotechnol. Lett.* **2010**, 32, 1-10; Ploegh *et al.*, WO 2010/087994 A2 (2010) y Mao *et al.*, WO 2005/051976 A2 (2005). El motivo de reconocimiento de la Sortasa A (en general, LPXTG, en donde X es cualquier aminoácido natural) se puede ubicar en el ligando Z, y el motivo aceptor nucleofílico (en general, GGG) puede ser el grupo R³¹ en la Fórmula (III), o viceversa.

Conjugados agonistas de TLR7

Mediante la aplicación de las técnicas descritas con anterioridad, se pueden preparar conjugados agonistas de TLR7 tales como los que se muestran a continuación:



en donde m es 1, 2, 3, o 4, y Ab es un anticuerpo.

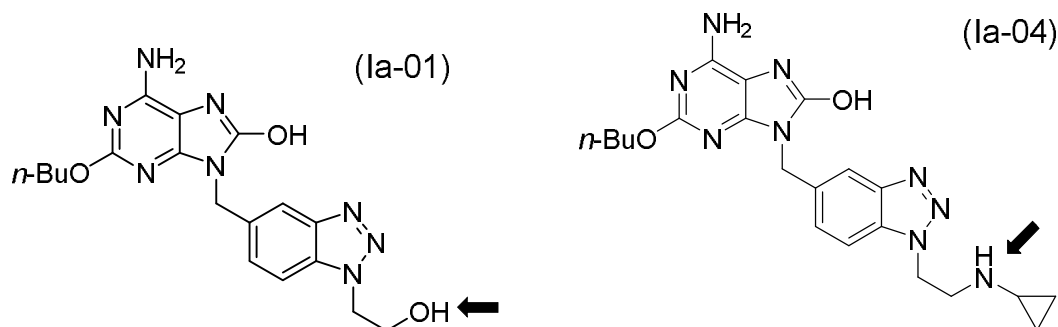
PEGILACIÓN

La unión de una cadena de poli(etilenglicol) (PEG) a un fármaco ("pegilación") puede mejorar las propiedades farmacocinéticas de este último. La semivida de circulación del fármaco se aumenta, a veces por encima de un orden de magnitud, reduciendo de manera concomitante la dosis necesaria para lograr un efecto terapéutico deseado. La pegilación también puede disminuir la degradación metabólica de un fármaco y reducir su inmunogenicidad. Para una reseña, véase Kolata *et al.*, *J. Controlled Release* 2014, 192, 167.

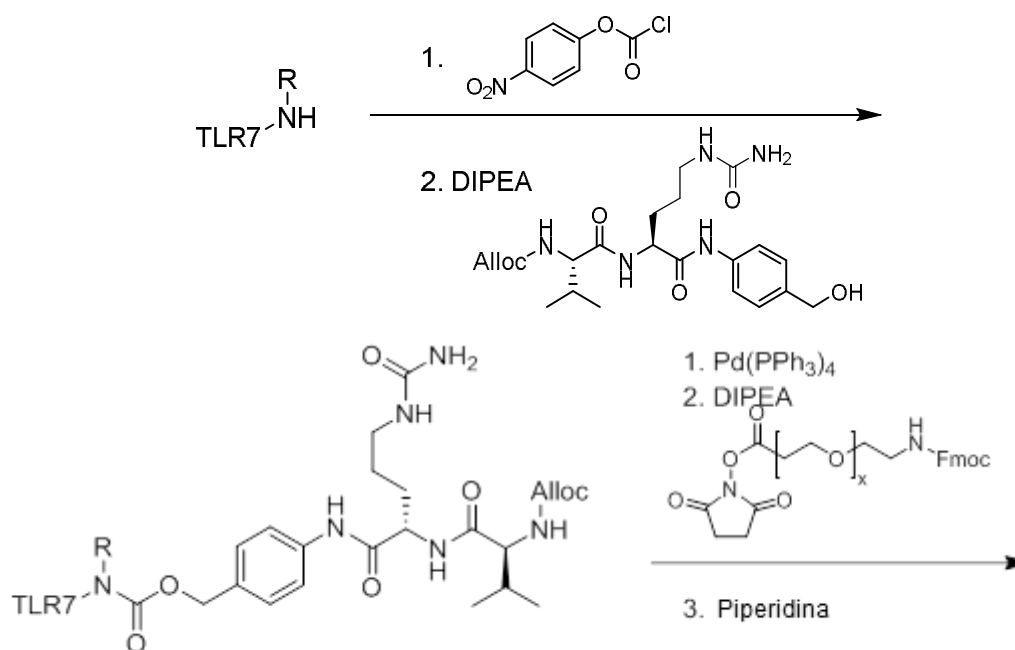
Inicialmente, la pegilación se aplicó a fármacos biológicos. Desde 2016, se aprobaron más de 10 compuestos biológicos pegilados. Turecek *et al.*, *J. Pharmaceutical Sci.* 2016, 105, 460. Más recientemente, estimulada por la aplicación exitosa del concepto a los compuestos biológicos, la atención se ha dirigido a su aplicación en fármacos de

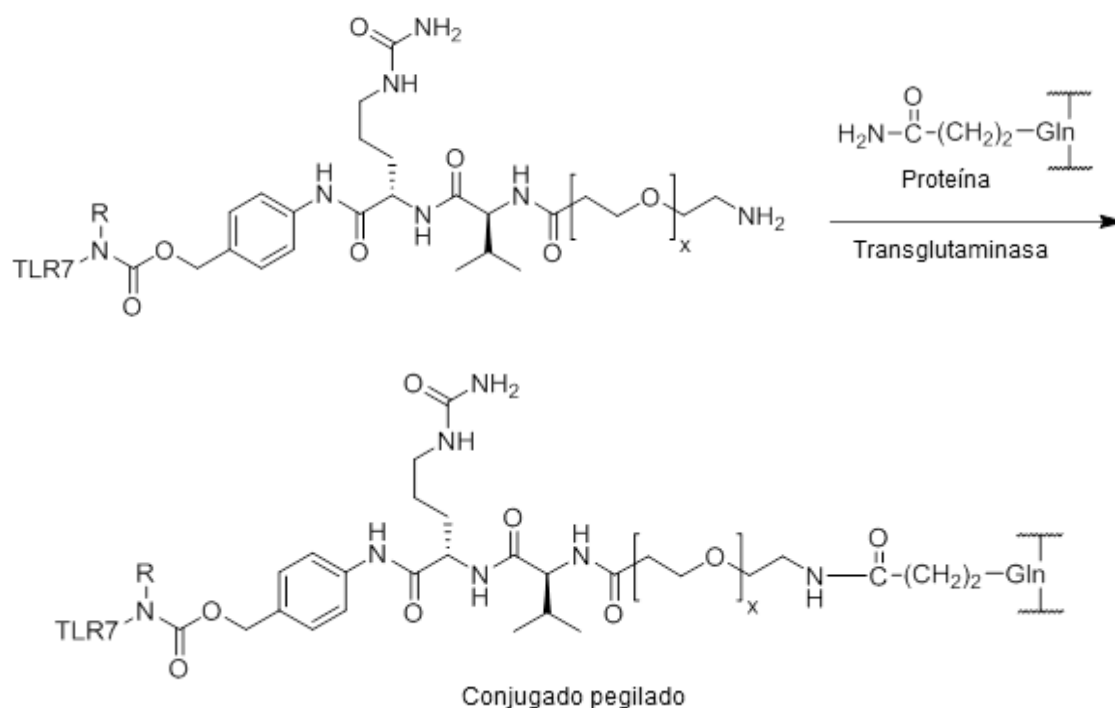
moléculas pequeñas. Además de los beneficios antes mencionados, los fármacos de moléculas pequeñas pegilados pueden tener mayor solubilidad y producir menos efectos tóxicos. Li *et al. Prog. Polymer Sci.* 2013, 38, 421.

Los compuestos descritos en la presente se pueden pegar – es decir, pueden tener una porción poli(etilenglicol) unida de manera covalente. Cuando un compuesto tiene un hidroxilo alifático o una amina primaria o secundaria alifática, como en el caso del compuesto **la-01** o **la-04** (flechas), se puede pegar mediante un grupo éster, amida, carbonato o carbamato con una molécula PEG que contiene carboxi utilizando técnicas convencionales tales como diciclohexilcarbodiimida, HATU, ésteres de N-hidroxisuccinimida, y similares. Otros métodos diversos para pegar moléculas farmacéuticas se describen en Alconcel *et al., Polymer Chem.* 2011, 2, 1442.



Si se desea, un agonista de TLR7 descrito en la presente se puede pegar mediante un ligador que se puede escindir en forma enzimática que comprende una porción que se autoinmola, para permitir la liberación del agonista no pegilado de una manera diseñada. Asimismo, la pegilación se puede combinar con conjugación con una proteína tal como un anticuerpo, si la molécula que contiene PEG tiene un grupo funcional adecuado tal como una amina para la unión a la proteína. La proteína puede proporcionar una función terapéutica adicional o, si es un anticuerpo, puede proporcionar una función de direccionamiento. Estos conceptos se ilustran en la siguiente secuencia de reacción, en donde TLR7-NH-R representa genéricamente un agonista de TLR7:

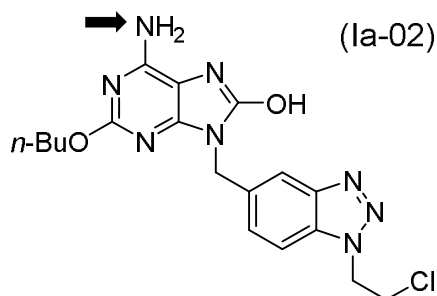




- 5 En la secuencia de reacción anterior, el dipéptido valina-citrulina (Val-Cit) se puede escindir mediante la enzima captesina B, con un grupo *p*-aminobencil oxycarbonilo (PABC) que funciona como un espaciador que se autoinmola. El grupo funcional para la conjugación es un grupo amina, que está temporalmente protegido por un grupo Fmoc. La conjugación se realiza mediante la enzima transglutaminasa, con una cadena lateral de glutamina (Gln) que actúa como aceptor de acilo. El subíndice *x*, que indica la cantidad de unidades de repetición de PEG, puede variar
- 10 ampliamente, según el fin de la pegilación, como se analiza más adelante. Para algunos fines, *x* puede ser relativamente pequeño, tal como 2, 4, 8, 12 o 24. Para otros fines, *x* es grande, por ejemplo, entre alrededor de 45 y alrededor de 910.

- 15 Las personas del oficio de nivel medio entenderán que la secuencia es ilustrativa y que se pueden usar otros elementos – péptido, grupo que se autoinmola, método de conjugación, largo de PEG, etc. –, como se sabe en el estado de la técnica. También entenderán que, si bien la secuencia anterior combina pegilación and conjugación, la pegilación no requiere conjugación, y viceversa.

- 20 Cuando el compuesto no tiene hidroxilo alifático o amina primaria o secundaria alifática, como en el caso del compuesto **la-02**, aún se puede pegar en la amina aromática (flecha). Un método para pegar en esta posición fue descrito por Zarraga, US 2017/0166384 A1 (2007).



- 25 Puede ser conveniente tener múltiples agonistas pegilados en una sola molécula. Por ejemplo, cuatro brazos pegilados se pueden construir en pentaeritritol ($C(CH_2OH)_4$), y un agonista de TLR7 se puede unir a cada brazo pegilado. Véase Gao *et al.*, US 2013/0028857 A1 (2013).

- 30 Para modular la farmacocinética, generalmente se prefiere que la porción PEG tenga un peso de fórmula de alrededor de 2 kDa (que corresponden a alrededor de 45 unidades de repetición $-(CH_2CH_2O)-$) a alrededor de 40 kDa (que corresponden a alrededor de 910 unidades de repetición $-(CH_2CH_2O)-$), con mayor preferencia, de alrededor de 5 kDa a alrededor de 20 kDa. Es decir, el rango del subíndice *x* en las fórmulas anteriores es de alrededor de 45 a alrededor de 910. Cabe destacar que las composiciones PEG no son 100 % homogéneas, sino que exhiben una distribución de

pesos moleculares. De este modo, una referencia a, por ejemplo, "PEG de 20kDa" significa PEG que tiene un peso molecular promedio de 20 kDa.

La pegilación también se puede usar para mejorar la solubilidad de un agonista. En tales casos, se puede usar una cadena PEG más corta, por ejemplo, que comprenda 2, 4, 8, 12 o 24 unidades de repetición.

Ejemplos

La práctica de la presente invención también se puede comprender en relación con los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo ilustrativo y no son limitativos.

Ejemplo 1 – Síntesis de agonistas de TLR7

Este ejemplo y la **Figura 1** se refieren a la síntesis de los compuestos de la presente invención.

Una suspensión de un compuesto **1** (CAS Reg. N.º 23814-12-2; 1,8 g, 11,03 mmol) en MeOH (20 ml) se trató con cloruro de tionilo (2,416 ml, 33,1 mmol) y se agregó por goteo a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 1h, después de lo cual la LCMS mostró que la reacción estaba completa. El solvente se evaporó usando un evaporador giratorio, y el éster crudo **2** se usó en la siguiente etapa. LCMS ESI: calculado para $C_8H_7N_3O_2$ = 178.05 (M+H⁺); encontrado: 178.0 (M+H⁺).

Una mezcla de éster **2** (1,954 g, 11,03 mmol), 2-bromoetan-1-ol (2,76 g, 22,06 mmol) y carbonato de potasio (2,287 g, 16,55 mmol) se calentó a 60 °C durante la noche en N,N-dimetilformamida (DMF). La LCMS mostró la formación de dos productos, los regioisómeros **3** y **4**. La mezcla sólida se filtró, y la DMF se evaporó en un evaporador V-10 para obtener la mezcla de producto crudo, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Una mezcla de regioisómeros **3** y **4** (2,440 g, 11,03 mmol) en DMF (10 ml) se trató con cloruro de *t*-butildimetilsililo (TBSCl, 1,995 g, 13,24 mmol) y luego con imidazol (1,502 g, 22,06 mmol), y se agitó durante 2 h. La LCMS mostró que la reacción se había completado. La reacción se preparó con EtOAc/ NaHCO₃ acuoso saturado. El producto crudo se purificó en un aparato COMBIFLASH™ usando una columna de gel de sílice de 80 g y se eluyó con 0-50 % de EtOAc/hexano para obtener regioisómeros **5** (0,9 g, 2,68 mmol, 24,32 % de rendimiento) y **6** (1,0 g, 2,98 mmol, 27,0 % de rendimiento). La regioquímica se determinó usando NOE entre el bencilmetileno y los protones cercanos en el anillo aromático. LCMS ESI: calculado para $C_{16}H_{25}N_3O_2Si$ = 336.16 (M+H⁺); encontrado: 336.1 (M+H⁺).

Luego de la separación mediante un aparato ISCO, una solución de regioisómero **5** (0,9 g, 2,68 mmol) en THF (10 ml) a 0 °C se trató con Red-Al (2,181 ml, 6,71 mmol) y se agitó durante 30 min. La LCMS mostró que la reacción se había completado. La reacción se inactivó mediante adición lenta de MeOH y se preparó con EtOAc/salmuera. El producto crudo **7** se usó en la siguiente etapa en el estado en que se encontraba.

Una solución del producto **7** (2,96 g, 9,63 mmol) en diclorometano (DCM, 20 ml) se trató con trifenilfosfina (2,78 g, 10,59 mmol) y se enfrió hasta 0 °C. Se agregó lentamente N-bromosuccinimida (NBS, 1,885 g, 10,59 mmol), y se eliminó el baño frío y se agitó durante 30 min, después de lo cual la LCMS mostró que la reacción se había completado. El solvente se evaporó, y el producto crudo se purificó en un aparato ISCO usando una columna Gold de 80 g que se eluyó con 0-50 % de EtOAc/hexanos para obtener el compuesto **8** deseado como una pasta incolora. LCMS ESI: calculado para $C_{15}H_{24}BrN_3OSi$ = 371.08 (M+H⁺); encontrado: 372.0 (M+H⁺).

Una solución del compuesto **9** (CAS Reg. N.º 473930-51-7, 1,577 g, 7,61 mmol) se trató con carbonato de cesio (2,73 g, 8,37 mmol), seguido del compuesto **8** (3,1 g, 8,37 mmol) y se calentó a 60 °C durante 1 h, después de lo cual la LCMS mostró que la reacción se había completado. El carbonato de cesio se filtró, y la mezcla de reacción se diluyó con 50 ml de EtOAc y se lavó 3 veces con agua. El producto se concentró y se purificó sobre una columna ISCO usando una columna de gel de sílice Gold de 120 g, que se eluyó con 0-50 % de EtOAc/hexanos para obtener el compuesto deseado **10** como un sólido blanco. LCMS ESI: calculado para $C_{24}H_{36}N_8OSi$ = 495.6 (M-H⁺); encontrado: 495.2 (M-H⁺).

Una solución del compuesto **10** (1,27 g, 2,56 mmol) y acetato de sodio (1,049 g, 12,78 mmol) en CHCl₃ (10 ml)/THF (5 ml) se enfrió hasta 0 °C y se trató lentamente con bromo (0,263 ml, 5,11 mmol) hasta que se completó la reacción. La reacción se inactivó con una solución acuosa al 10 % de bisulfito de sodio y se extrajo con EtOAc. El producto crudo bromado seco se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Una solución del producto crudo bromado (1474 mg, 2,56 mmol) y metanolato de litio (972 mg, 25,6 mmol) en MeOH (10 ml) se calentó a 60 °C durante la noche, después de lo cual la LCMS mostró desplazamiento de bromo. El MeOH se evaporó, y la suspensión resultante se trató con HCl acuoso (4,27 ml, 25,6 mmol) y se calentó a 60 °C durante 2 h, después de lo cual la LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se neutralizó mediante la adición lenta de NaOH acuoso, y el filtrado resultante se lavó con agua. El sólido se secó para obtener un producto crudo **1a-01** como un sólido amarillento. El producto crudo se purificó en una HPLC preparativa Shimadzu con columna xBridge PrepC18 5µm 19x150 mm y se eluyó con 0-50 % de MeOH/H₂O (0,1 % de ácido fórmico), y se

recolectaron las fracciones que contenían el producto, y el solvente se evaporó con un evaporador V-10 para obtener el compuesto **la-01** deseado como una pasta incolora. LCMS ESI: calculado para $C_{18}H_{22}N_8O_3 = 397.4$ (M-H⁺), encontrado: 397.2 (M-H⁺).

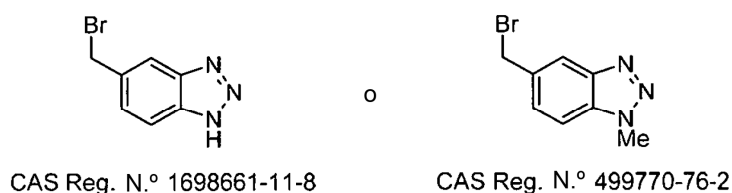
- 5 Una solución del compuesto **la-01** (30 mg, 0,075 mmol) se trató con cloruro de tionilo (10,99 μ l, 0,151 mmol) y se sometió a ultrasonido durante 1 h, después de los cual la LCMS mostró que la reacción se había completado. El solvente se evaporó usando un evaporador V-10, y el producto crudo se purificó en una HPLC preparativa Shimadzu con columna xBridge PrepC18 5 μ m 19x150 mm y se eluyó con 0-50 % de MeOH/H₂O (0,1 % de ácido fórmico), y se recolectaron las fracciones que contenían el producto, y el solvente se evaporó usando un evaporador V-10 para obtener el compuesto **la-02** deseado como una pasta incolora. LCMS ESI: calculado para $C_{18}H_{21}ClN_8O_2 = 415.8$ (M-H⁺), encontrado: 415.2 (M-H⁺).

- 15 Una solución del compuesto **la-02** (0,031 g, 0,075 mmol) en DMF (0,5 ml) se trató con ciclobutanamina (0,027 g, 0,375 mmol) y se calentó a 70 °C durante 2 h. La LCMS mostró que la reacción se había completado. El producto crudo se purificó en una HPLC preparativa Shimadzu con columna xBridge PrepC18 5 μ m 19x150 mm y se eluyó con 0-50 % de MeOH/H₂O (0,1 % de ácido fórmico), y se recolectaron las fracciones que contenían el producto, y el solvente se evaporó usando un evaporador V-10 para obtener el producto **la-05** deseado como una pasta incolora. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.84 – 7.73 (m, 1H), 7.45 (dd, *J* = 8.7, 1.5 Hz, 1H), 6.44 – 6.38 (m, 2H), 4.96 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 4.59 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H), 4.08 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.12 – 2.97 (m, 1H), 2.87 (td, *J* = 6.3, 2.1 Hz, 2H), 1.98 – 1.87 (m, 2H), 1.54 (dt, *J* = 8.1, 6.3 Hz, 2H), 1.51 – 1.35 (m, 4H), 1.29 (qd, *J* = 7.4, 4.5 Hz, 2H), 0.82 (td, *J* = 7.3, 5.3 Hz, 3H). LCMS ESI: calculado para $C_{22}H_{29}N_9O_2 = 450.5$ (M-H⁺); encontrado: 450.2 (M-H⁺).

- 25 Siguiendo en general el procedimiento anterior, pero usando diferentes aminas en lugar de ciclobutanamina, se prepararon otros compuestos de acuerdo con la Fórmula (I), como se indica en la Tabla B a continuación:

Tabla B – Compuestos adicionales			
Número de compuesto	Amina	Espectro de masa	
		Masa prevista (M-H) ⁺	Masa observada (M-H) ⁺
la-03		452,5	453,2
la-04		436,5	436,2
la-06		452,5	452,3
la-07		466,5	466,3
la-08		551,6	551,3
la-09		486,5	486,2
la-10		487,5	487,2

Los compuestos de la Fórmula (I) en donde R³ es H o Me se pueden preparar mediante alquilación del compuesto 9 con



respectivamente, aplicando las técnicas descritas anteriormente en la presente, *mutatis mutandis*.

Ejemplo 2 – Ensayo de actividad agonista de TLR7

- 5 Este ejemplo describe un método para evaluar la actividad agonista de TLR7 de los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva.

Las células blue de riñón embrionario humano modificadas por ingeniería genética (células HEK-Blue™ TLR; Invivogen) que poseen un transgén indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) por TLR7 humano se suspendieron en un medio de cultivo no selectivo (DMEM con alta glucosa (Invitrogen), enriquecido con 10 % de suero bovino fetal (Sigma)). Las células HEK-Blue™ TLR7 se agregaron a cada cavidad de una placa de cultivo tisular de 384 cavidades (15.000 células por cavidad) y se incubaron 16-18 h a 37 °C, 5 % de CO₂. Los compuestos (100 nI) se distribuyeron en cavidades que contenían las células HEK-Blue™ TLR y las células tratadas se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂. Luego de 18 h de tratamiento, se agregaron 10 microlitros de reactivo Quanti-Blue™ recientemente preparado (Invivogen) a cada cavidad, se incubaron durante 30 min (37 °C, 5 % de CO₂) y se midieron los niveles de SEAP usando un lector de placas Envision (OD = 620 nm). Se calcularon los valores de concentración efectiva máxima media (EC₅₀; concentración del compuesto que induce una respuesta intermedia entre el valor inicial y máximo del ensayo).

- 20 La **Figura 4** es un gráfico ilustrativo que muestra los datos así obtenidos para un compuesto de la invención (Ia-01).

Ejemplo 3 – Inducción de IL-6

- 25 Este ejemplo describe un método para evaluar la inducción de interleucina 6 mediante los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva.

Los compuestos diluidos en DMSO se transfirieron a cavidades individuales de una placa de 384 cavidades con fondo en forma de V transparente de Matrix Technologies usando tecnología de manipulación de líquidos acústica ECHO (25 nI por cavidad). Se agregaron muestras de sangre humana (25 ul) a cada cavidad usando un instrumento de manipulación de líquidos FeliX de CyBio. La placa se agitó en un agitador de placas durante 3 min antes de incubar las mezclas de reacción a 37 °C durante 20 h. Luego, se agregó medio basal RPMI 1640 (enriquecido con L-glutamina) a cada cavidad (25 ul por cavidad) antes de liberar plasma de cada muestra mediante centrifugación (450 x g, 5 min, temperatura ambiente). Las muestras de plasma tratadas (3 ul) se transfirieron posteriormente a cavidades individuales de una placa ProxiPlate de 384 cavidades blanca con poca profundidad (Perkin Elmer) usando un instrumento de manipulación de líquidos FeliX, y sus niveles de interleucina 6 se midieron usando tecnología AlphaLISA como lo describe el fabricante, PerkinElmer. El *software* de análisis de datos se usó para determinar los valores de EC₅₀ del compuesto en donde el valor inicial se estableció usando valores de DMSO promedio y 100 % de inducción establecida usando valores de compuesto de referencia a la mayor concentración evaluada. La EC₅₀ se puede determinar con un *software* tal como Graphpad Prism™.

40

Ejemplo 4 – Conjugación mediada por transglutaminasa

El siguiente procedimiento se puede usar para la conjugación mediada por transglutaminasa de compuestos agonista-ligador, en donde el ligador tiene un grupo amina que puede actuar como un donante de amina. El anticuerpo puede ser uno que tiene una glutamina que reacciona a transglutaminasa, por ejemplo, uno con una sustitución N297A o N297Q. La transglutaminasa bacteriana recombinante con una relación molar de anticuerpo:enzima de 5:1 realiza la conjugación. La conjugación se realiza usando protocolos estándares en 50 mM de amortiguador Tris, pH 8,0, incubado durante la noche a 37 °C. El conjugado resultante se purifica en una columna de proteína A, equilibrada previamente con 50 mM de Tris, pH 8,0. El conjugado se eluye con amortiguador de citrato de sodio 0,1 M, pH 3,5. Las fracciones eluidas se neutralizan con Tris 1 M, pH 9,0. El conjugado se puede formular en 20 mg/ml de sorbitol, 10 mg/ml de glicina, pH 5,0.

Las personas del oficio de nivel medio comprenderán que las condiciones y las metodologías en el presente ejemplo son ilustrativas y no limitativas, y que en el estado de la técnica se conocen variaciones de estas u otros enfoques de conjugación que se pueden utilizar en la presente invención.

55

La descripción detallada anterior de la invención incluye pases que se relacionan principal o exclusivamente con partes o aspectos particulares de la invención. Debe tenerse en cuenta que esto se realiza para una mayor claridad y conveniencia, que una característica particular puede ser relevante en más de un solo pase en el cual se describe y que la descripción de la presente incluye todas las combinaciones adecuadas de la información que se encuentra en los diferentes pases. De manera similar, si bien las distintas figuras y descripciones de la presente se relacionan con formas de realización específicas de la invención y aspectos de la divulgación, se debe tener en cuenta que cuando se describe una característica específica en el contexto de una figura o forma de realización particulares, la figura también se puede usar, con el alcance adecuado, en el contexto de otra figura o forma de realización, en combinación con otra figura o en la invención en general.

65

Asimismo, si bien la presente invención se ha descrito particularmente en términos de ciertas formas de realización preferidas, la invención no se limita a esas formas de realización preferidas. En cambio, el alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

5 Referencias

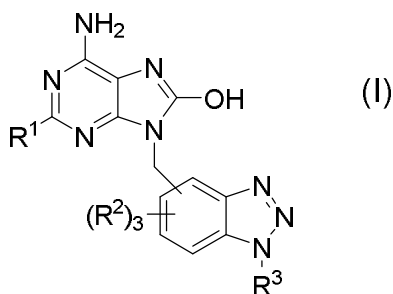
A continuación se proporcionan las citas completas de las siguientes referencias citadas de manera abreviada por el primer autor (o inventor) y la fecha, en la presente memoria descriptiva.

- 10 Akinbobuyi *et al.*, ACS 2013 69th Southwest Regional Meeting, Abstract SWRM-70, "Synthesis and evaluation of purine-based toll-like receptor 7 agonists and their antibody conjugates."
- 15 Akinbobuyi *et al.*, ACS 2015 Joint Southeastern/Southwest Regional Meeting, Abstract 392, "Synthesis of functionalized purine analogs for antibody conjugation" [2015a].
- Akinbobuyi *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56, 458, "Facile syntheses of functionalized toll-like receptor 7 agonists" [2015b].
- 20 Akinbobuyi *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 4246, "Synthesis and immunostimulatory activity of substituted TLR7 agonists."
- Barberis *et al.*, US 2012/0003298 A1 (2012).
- 25 Beesu *et al.*, *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 2084, "Identification of High-Potency Human TLR8 and Dual TLR7/TLR8 Agonists in Pyrimidine-2,4-diamines."
- Berghöfer *et al.*, *J. Immunol.* **2007**, 178, 4072, "Natural and Synthetic TLR7 Ligands Inhibit CpG-A- and CpG-C-Oligodeoxynucleotide-Induced IFN- α Production."
- 30 Bonfanti *et al.*, US 2014/0323441 A1 (2015) [2015a].
- Bonfanti *et al.*, US 2015/0299221 A1 (2015) [2015b].
- Carson *et al.*, US 2013/0202629 A1 (2013).
- 35 Carson *et al.*, US 8.729.088 B2 (2014).
- Carson *et al.*, US 9.050.376 B2 (2015).
- 40 Carson *et al.*, US 2016/0199499 A1 (2016).
- Chan *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 1194, "Synthesis and Immunological Characterization of Toll-Like Receptor 7 Agonistic Conjugates."
- 45 Chan *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 445, "Synthesis and Characterization of PEGylated Toll Like Receptor 7 Ligands."
- Cortez *et al.*, US 2017/0044168 A1 (2017). [2017a].
- 50 Cortez *et al.*, US 2017/0121421 A1 (2017). [2017b].
- Desai *et al.*, US 9.127.006 B2 (2015).
- Ding *et al.*, WO 2016/107536 A1 (2016).
- 55 Ding *et al.*, US 2017/0273983 A1 (2017) [2017a].
- Ding *et al.*, WO 2017/076346 A1 (2017) [2017b].
- 60 Gadd *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2015**, 26, 1743, "Targeted Activation of Toll-Like Receptors: Conjugation of a Toll-Like Receptor 7 Agonist to a Monoclonal Antibody Maintains Antigen Binding and Specificity."
- Graupe *et al.*, US 8.993.755 B2 (2015).
- 65 Halcomb *et al.*, US 9.161.934 B2 (2015).

- Hashimoto *et al.*, US 2009/0118263 A1 (2009).
- Hirota *et al.*, US 6.028.076 (2000).
- 5 Holldack *et al.*, US 2012/0083473 A1 (2012).
- Isobe *et al.*, US 6.376.501 B1 (2002).
- Isobe *et al.*, JP 2004137157 (2004).
- 10 Isobe *et al.*, *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (6), 2088, "Synthesis and Biological Evaluation of Novel 9-Substituted-8-Hydroxyadenine Derivatives as Potent Interferon Inducers."
- Isobe *et al.*, US 7.521.454 B2 (2009) [2009a].
- 15 Isobe *et al.*, US 2009/0105212 A1 (2009) [2009b].
- Isobe *et al.*, US 2011/0028715 A1 (2011).
- 20 Isobe *et al.*, US 8.148.371 B2 (2012).
- Jensen *et al.*, WO 2015/036044 A1 (2015).
- Kasibhatla *et al.*, US 7.241.890 B2 (2007).
- 25 Koga-Yamakawa *et al.*, *Int. J. Cancer* **2013**, 132 (3), 580, "Intratracheal and oral administration of SM-276001: A selective TLR7 agonist, leads to antitumor efficacy in primary and metastatic models of cancer."
- Li *et al.*, US 9.902.730 B2 (2018).
- 30 Lioux *et al.*, US 9.295.732 B2 (2016).
- Lund *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci (USA)* **2004**, 101 (15), 5598, "Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7."
- 35 Maj *et al.*, US 9.173.935 B2 (2015).
- McGowan *et al.*, *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 6137, "Identification and Optimization of Pyrrolo[3,2-d]pyrimidine Toll-like Receptor 7 (TLR7) Selective Agonists for the Treatment of Hepatitis B."
- 40 Musmuca *et al.*, *J. Chem. Information & Modeling* **2009**, 49 (7), 1777, "Small-Molecule Interferon Inducers. Toward the Comprehension of the Molecular Determinants through Ligand-Based Approaches."
- Ogita *et al.*, US 2007/0225303 A1 (2007).
- 45 Peterson, Rachel; Honor Program Thesis, "Synthesis of Sulfur and Amino-8-Substituted Adenine Derivatives as TLR7 Agonists," Baylor University (2014).
- Pryde, US 7.642.350 B2 (2010).
- 50 Roethle *et al.*, *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 7324, "Identification and Optimization of Pteridinone Toll-like Receptor 7 (TLR7) Agonists for the Oral Treatment of Viral Hepatitis."
- Seifert, Zacharie; Master of Science Thesis, "Synthesis and Evaluation of 8-Substituted Adenine Derivatives as Toll-like Receptor 7 Agonists," Baylor University (2015).
- 55 Vernejoul *et al.*, US 2014/0141033 A1 (2014).
- Yu *et al.*, *PLoS One* **2013**, 8 (3), e56514, "Toll-Like Receptor 7 Agonists: Chemical Feature Based Pharmacophore Identification and Molecular Docking Studies."
- 60 Zhang *et al.*, *Immunity* **2016**, 45, 737, "Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA."
- 65 Zurawski *et al.*, US 2012/0231023 A1 (2012).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula (I)



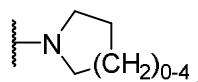
en la que

R¹ es (C₁-C₅ alquilo)O, (C₁-C₂ alquilo)O(CH₂)₂₋₃O, (C₁-C₅ alquilo)C(=O)O, (C₁-C₅ alquilo)NH, (C₁-C₂ alquilo)O(CH₂)₂₋₃NH o (C₁-C₅ alquilo)C(=O)NH;

R² es, independientemente de cada caso, H, C₁-C₃ alquilo, halo, O(C₁-C₃ alquilo), CN o NO₂;

R³ es H, Me o (CH₂)_xR⁴, en donde el subíndice x es 2, 3 o 4; y

R⁴ es H, halo, OH, CN, NH₂, NH(C₁-C₅ alquilo), N(C₁-C₅ alquilo)₂, NH(C₃-C₆ cicloalquilo), NH(C₄-C₈ bicicloalquilo), NH(C₆-C₁₀ espirocicloalquilo), N(C₃-C₆ cicloalquilo)₂, NH(CH₂)₁₋₃(arilo), N((CH₂)₁₋₃(arilo))₂, una porción amina cíclica que tiene la estructura



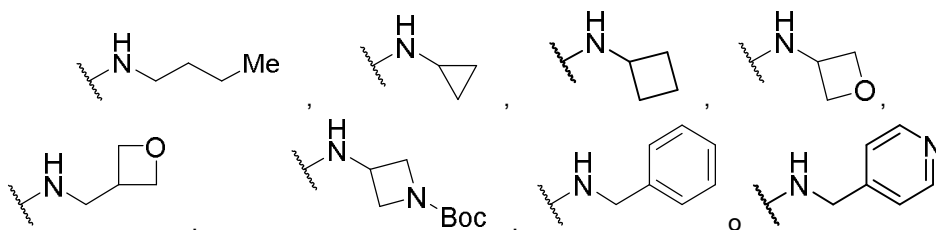
una porción aromática o heteroaromática de 6 miembros o una porción heteroaromática de 5 miembros;

en donde

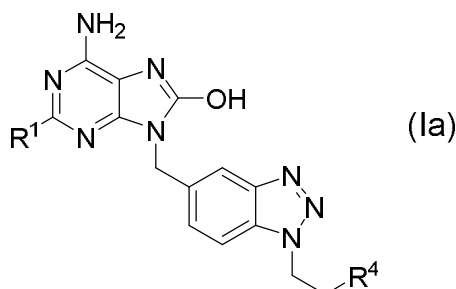
una porción alquilo, cicloalquilo, bicicloalquilo, espirocicloalquilo, amina cíclica, aromática o heteroaromática de 6 miembros o heteroaromática de 5 miembros se sustituye opcionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados de OH, halo, CN, (C₁-C₃ alquilo), O(C₁-C₃ alquilo), C(=O)(Me), SO₂(C₁-C₃ alquilo), C(=O)(Et), NH₂, NH(Me), N(Me)₂, NH(Et), N(Et)₂ y N(C₁-C₃ alquilo)₂; y

una porción cicloalquilo, bicicloalquilo, espiroalquilo o amina cíclica puede tener un grupo CH₂ reemplazado por O, S, NH, N(C₁-C₃ alquilo) o N(Boc).

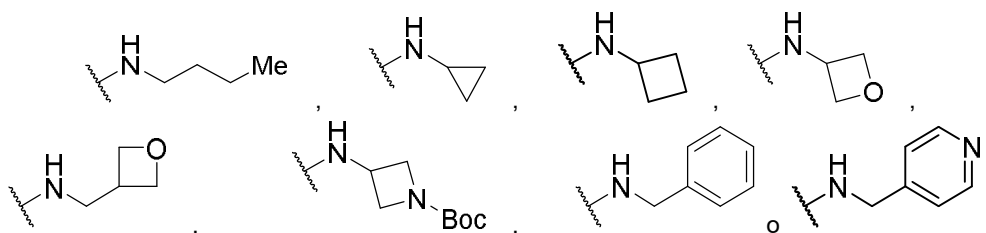
2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R¹ es *n*-BuO o MeOCH₂CH₂O, y R⁴ es OH, Cl,



3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura representada por la Fórmula (Ia)

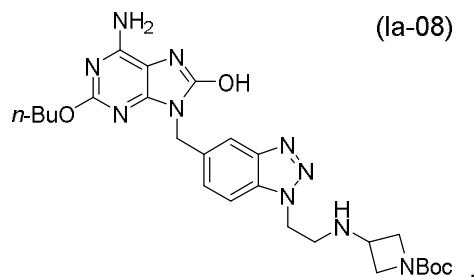
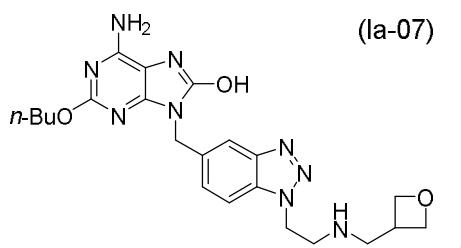
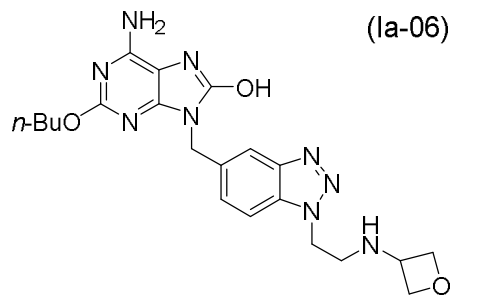
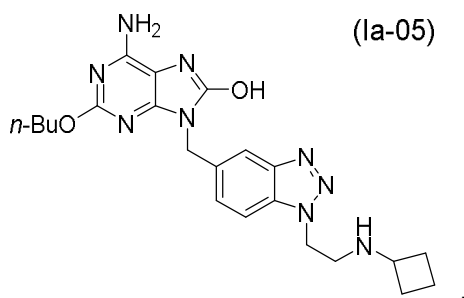
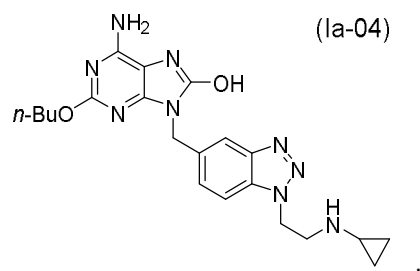
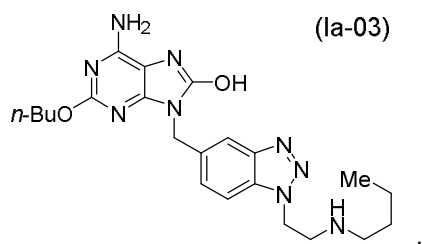
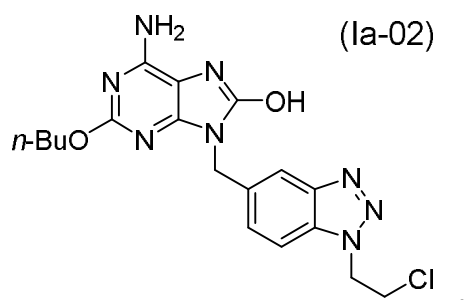
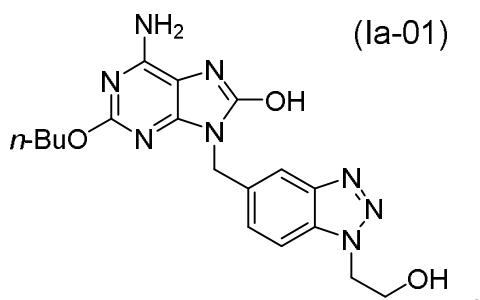


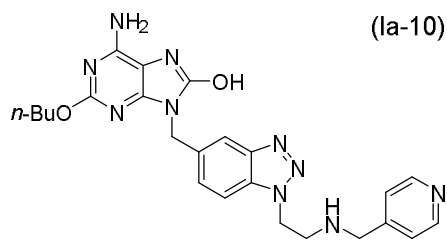
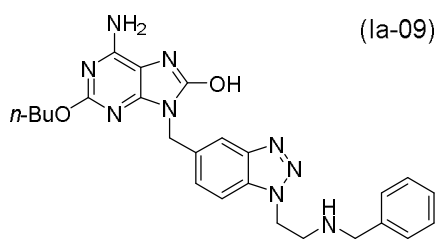
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en donde R¹ es *n*-BuO o MeOCH₂CH₂O, y R⁴ es OH, Cl,



5. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 4, en donde R¹ es *n*-BuO.

6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, seleccionado del grupo que consiste en:

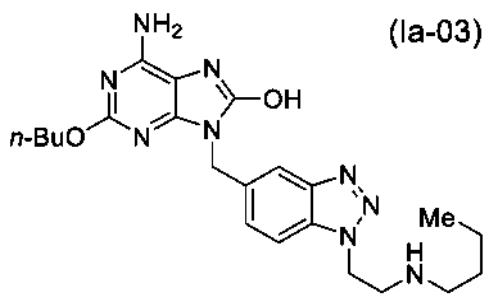




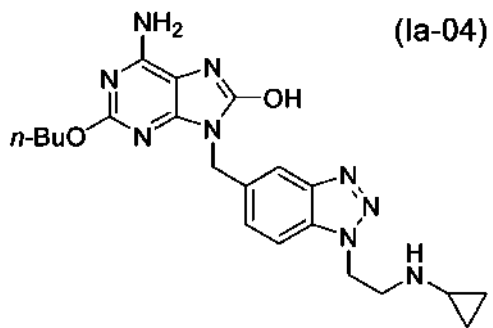
7. Un conjugado que comprende un compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior conjugado a un anticuerpo.

8. Un derivado de un compuesto de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el compuesto está unido de manera covalente a una porción poli(etilenglicol) con un tamaño de 2 kDa a 40 kDa.

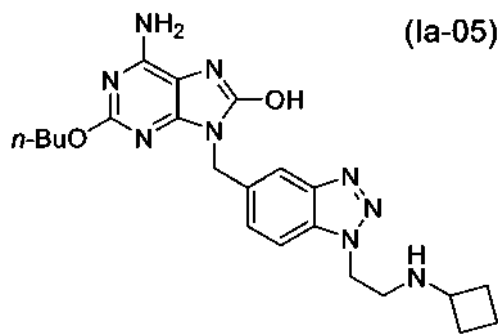
9. Un compuesto de las reivindicaciones 1 o 6, en donde el compuesto es



10. Un compuesto de las reivindicaciones 1 o 6, en donde el compuesto es



11. Un compuesto de las reivindicaciones 1 o 6, en donde el compuesto es



12. Un compuesto de las reivindicaciones 1 o 6, en donde el compuesto es

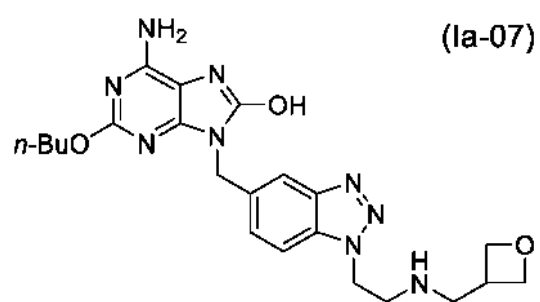


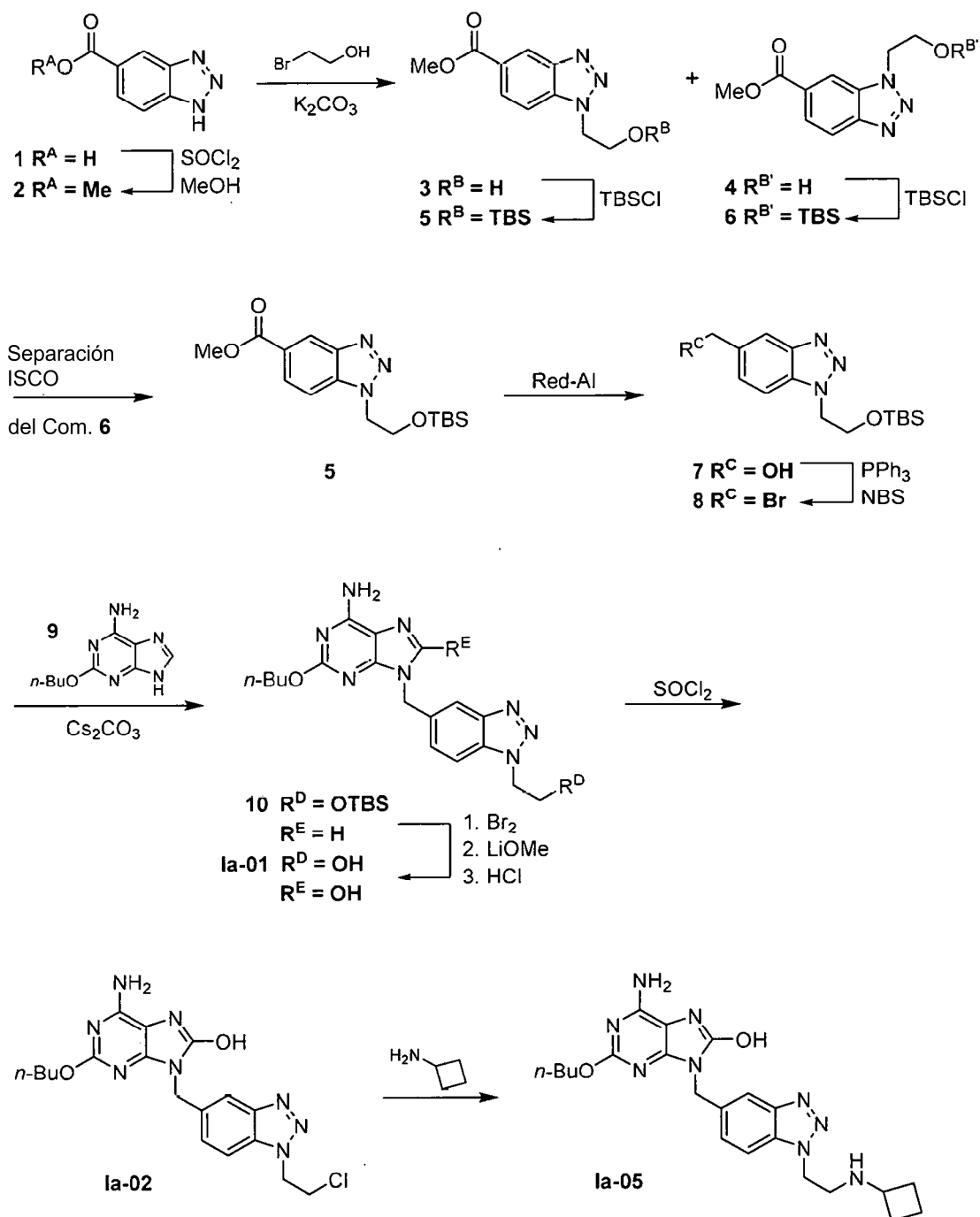
FIG. 1

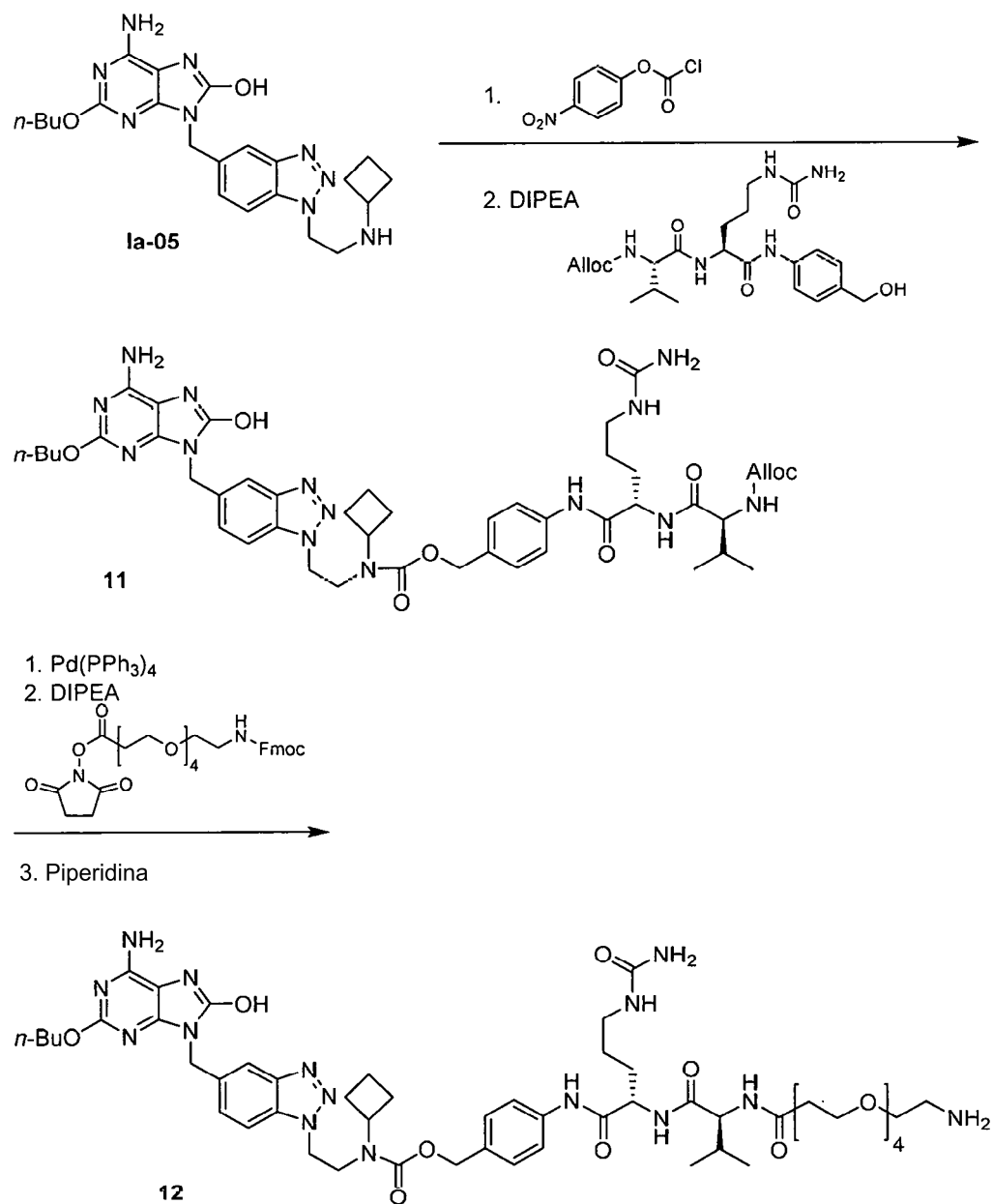
FIG. 2

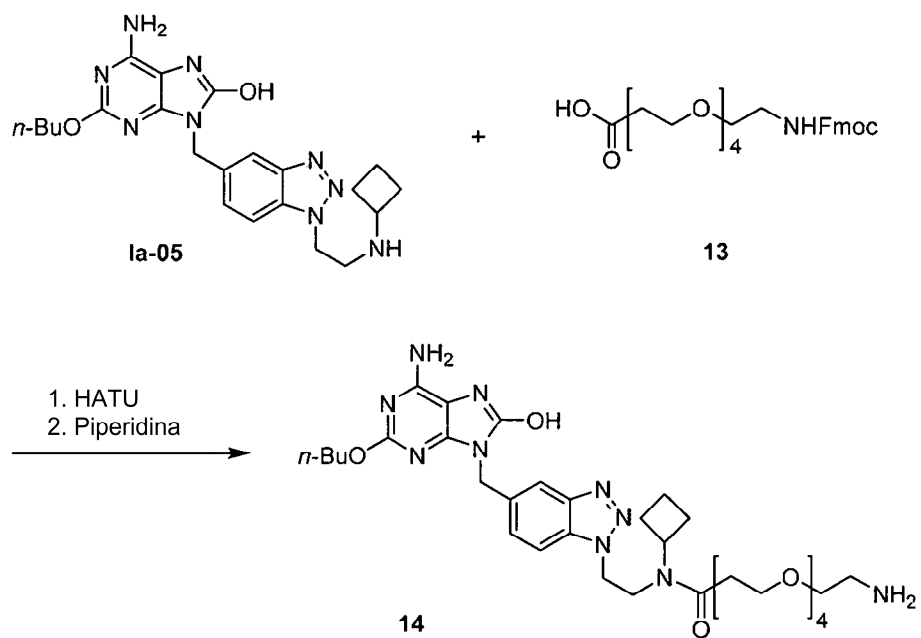
FIG. 3

FIG. 4