

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 724**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54 (2007.01)

A61K 47/69 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/522 (2006.01)

C07D 473/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2016 PCT/JP2016/004375**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.04.2017 WO17056494**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2016 E 16782095 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3355933**

54 Título: **Compuestos de adenina conjugados y su uso como adyuvantes de vacunas**

30 Prioridad:

29.09.2015 US 201562234481 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2021

73 Titular/es:

**SUMITOMO DAINIPPON PHARMA CO., LTD.
(100.0%)
6-8, Dosho-machi 2-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 541-8524, JP**

72 Inventor/es:

**BAN, HITOSHI;
NISHIO, YUKIHIRO;
MALYALA, PADMA;
MURALIDHARA, BILIKALLAHALLI K. y
WONG, MARCUS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 805 724 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

Compuestos de adenina conjugados y su uso como adyuvantes de vacunas

5 **Campo**

La presente memoria descriptiva se refiere a compuestos de adenina conjugados y sales farmacéuticamente aceptables de estos. Estos compuestos tienen propiedades inmunoestimulantes y, por lo tanto, pueden ser útiles en terapia, por ejemplo, como adyuvantes de vacunas. La presente memoria descriptiva también se refiere a un proceso para preparar compuestos de adenina conjugados y sales farmacéuticamente aceptables de estos, y a composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de adenina conjugados y sales farmacéuticamente aceptables de estos.

Antecedentes

Una vacuna que comprende una proteína o su péptido parcial derivado de un microorganismo (una «vacuna de subunidad») es ventajosa ya que puede prepararse convenientemente mediante síntesis química o técnicas recombinantes y puede tener una seguridad superior a las vacunas vivas o vacunas inactivadas. Sin embargo, tales vacunas de subunidades tienden a exhibir una actividad inmunoestimulante más baja que las vacunas vivas o las alternativas de vacunas inactivadas. Con el fin de mejorar la actividad inmunoestimulante de las vacunas de subunidades, se pueden administrar con un adyuvante de vacuna en combinación con un antígeno.

Un adyuvante de vacuna es un aditivo que mejora la respuesta inmunitaria de los mamíferos y/o la respuesta inmunitaria celular a un antígeno. El alumbre, la saponina y similares se usan como adyuvantes de vacunas.

Recientemente, se ha descubierto que los Receptores de tipo Toll («TLR», por sus siglas en inglés) desempeñan una función importante en la activación de la inmunidad innata, que es uno de los mecanismos comunes de defensa del hospedador contra los microorganismos. Los agentes modificadores de la inmunidad, como el lípido A monofosforilo (MPL, por sus siglas en inglés), CPG ODN y similares, pueden exhibir actividad inmunoestimulante a través de TLR.

Entre los 13 TLR conocidos identificados en seres humanos, varios están asociados con el reconocimiento de componentes bacterianos (TLR 1, 2, 4, 5 y 6), ARN viral (TLR 3, 7 y 8) o ADN no metilado (TLR 9) (véase la referencia de documentos que no son patentes 1).

Se sabe que los activadores de TLR 7 y TLR 8 incluyen miméticos de bajo peso molecular de ARN viral monocatenario que es un ligando natural para los receptores en cuestión. Por ejemplo, ya se ha publicado que los compuestos sintéticos tales como los compuestos de 8-oxoadenina (véanse las referencias de patentes 1, 2 y 3) y los compuestos de imidazoquinolina (véase la referencia de patentes 4) que mimetizan el ARN viral activan TLR 7 y/o TLR 8.

Cuando se activan TLR 7 y/o TLR 8, se inducen las células Th1 a través de una ruta de transducción de señal dependiente de TLR/MyD88 para activar las células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés). En consecuencia, se potencia la expresión de las moléculas coestimuladoras de linfocitos T (CD80, CD86 y CD40) y se producen citocinas inflamatorias que incluyen interferón de tipo I (particularmente IFN α), IFN γ , TNF α , IL-6 o IL-12.

También se sabe que los activadores de TLR 7 y/o TLR 8 activan los linfocitos B y estimulan adicionalmente las células NK para promover la producción de IFN γ , así como también la activación de DC. Se espera que estas rutas contribuyan a la actividad adyuvante de la vacuna. Ciertamente, ya se ha notificado la actividad adyuvante de los activadores de TLR 7/TLR 8 tales como Resiquimod e Imiquimod (véanse las referencias de documentos que no son patentes 2 y 3).

Sin embargo, resulta deseable desarrollar un adyuvante de vacuna novedoso para activar TLR 7 y/o TLR 8.

El escualeno es una sustancia oleosa utilizada como ingrediente en formulaciones de emulsiones de aceite en agua o agua en aceite. Se sabe que potencia la actividad inmunoestimulante de un antígeno cuando se utiliza como tensioactivo en emulsiones de agua en aceite o aceite en agua asociado con un antígeno. De hecho, el escualeno se usa como una sustancia base del adyuvante de vacuna conocido MF59, que es útil como una vacuna contra la gripe (véanse las referencias de documentos que no son patentes 4, 5 y 6).

Se conocen complejos de activadores de TLR 7 y/o TLR8 y otra sustancia. Por ejemplo, se ha notificado que un adyuvante de vacuna preparado mediante la unión covalente de un ácido graso y un compuesto de imidazoquinolina permite que un activador de TLR 7 se ubique en el tejido diana, y de esta manera se reduce el metabolismo y la toxicidad del activador de TLR 7 (véanse las referencias de patentes 5, 6 y 7, y referencia de documentos que no son patentes 7). Además, existe constancia de un complejo de un glicérido de ácido graso y un compuesto de imidazoquinolina (véase la referencia de patentes 8), un complejo de un glicérido de ácido graso y un compuesto de adenina (véase la referencia de patentes 9), y un complejo de fosfolípidos y un compuesto de adenina (véase la referencia de patentes 10). También se ha notificado un complejo de un glicérido de ácido graso y un compuesto de adenina a través de polietilenglicol (véase la referencia de patentes 11).

Sin embargo, aún no se han notificado complejos de un activador de TLR 7/8 y escualeno.

Lista de citas

5 Bibliografía de documentos que no son patentes

- [NPL 1] Iwasaki, A., *Nat. Immunol.* 2004, 5, 987.
 [NPL 2] Steinhagen, F. *et al.*, *Vaccine* 2011, 29, 3341.
 [NPL 3] M. A. Tomai *et al.*, *Exp. Rev. Vaccine*, 6, 835.
 [NPL 4] G. Ott *et al. Methods in Molecular Medicine*, 2000, 42, 211-228.
 [NPL 5] D. T. O'Hagan *et al. Vaccine* 2012, 4341-4348.
 [NPL 6] CB Fox, *Molecules* 2009, 14, 3286.
 [NPL 7] Smirnov, D. *et al.*, *Vaccine* 2011, 29, 5434.

15 Bibliografía de patentes

- [PTL 1] WO 99/28321
 [PTL 2] WO 02/85905
 [PTL 3] WO 2008/114817
 [PTL 4] US 4689338 B
 [PTL 5] WO 2005/001022
 [PTL 6] WO 2005/018555
 [PTL 7] WO 2012/024284
 [PTL 8] WO 2010/048520
 [PTL 9] WO 2011/017611
 [PTL 10] WO 2011/139348
 [PTL 11] WO 2010/093436

Resumen

Problema técnico

El problema que se va a resolver mediante la presente memoria descriptiva consiste en proporcionar compuestos novedosos con propiedades útiles en terapia, y en particular en aplicaciones de adyuvantes de vacunas.

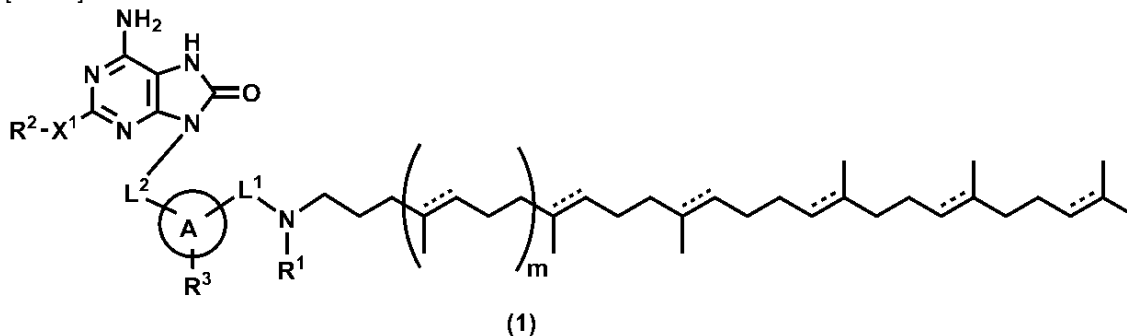
Solución al problema

Los presentes inventores han estudiado ampliamente el problema anterior y han preparado ciertos compuestos conjugados que comprenden un modulador de TLR 7 de tipo adenina unido a una sustancia oleosa a través de un espaciador. Como se muestra en la sección de aplicabilidad industrial, estos compuestos conjugados exhiben actividad adyuvante de vacuna que potencia la actividad inmunoestimulante de una sustancia antigénica. Sorprendentemente, los compuestos conjugados de la memoria descriptiva también demuestran una actividad adyuvante más potente que la del compuesto de adenina y la sustancia oleosa solos. Como tal, se ha observado que los compuestos conjugados de la memoria descriptiva resuelven el problema técnico mencionado.

La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier tema que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos. Cualesquiera referencias en la descripción a los métodos de tratamiento se refieren a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. En resumen, la presente memoria descriptiva se refiere a las siguientes realizaciones.

[1] Un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable:

[Quím.]



donde

L¹ y L² son independientemente alquileo;

R¹ es un átomo de hidrógeno o alquilo;
 R² es alquilo sustituido opcionalmente;
 R³ es un átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, alquilo o alcoxi;
 X¹ es un enlace sencillo, átomo de oxígeno, átomo de azufre, SO, SO₂, NR⁴ o CONR⁴;
 R⁴ es un átomo de hidrógeno o alquilo;
 A es carbociclo aromático monocíclico, o heterociclo aromático de 5 o 6 miembros que incluye de 1 a 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en de 1 a 4 átomos de nitrógeno, un átomo de oxígeno y un átomo de azufre;
 m es 0 o 1; y
 un enlace descrito por

[Quím. 2]

representa independientemente un enlace sencillo o un enlace doble.

[2] El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con [1] o su sal farmacéuticamente aceptable, donde

L¹ es alquileo C₁₋₄;

L² es alquileo C₁₋₄;

R¹ es un átomo de hidrógeno o alquilo C₁₋₄;

R² es alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente por de 1 a 4 grupos que pueden ser idénticos o diferentes, seleccionados entre hidroxilo, átomo de halógeno, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, haloalcoxi C₁₋₆, amino sustituido opcionalmente con uno o dos alquilos C₁₋₆ que pueden ser idénticos o diferentes, y carboxi;
 R³ es un átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, alquilo C₁₋₄ o alcoxi C₁₋₄;

X¹ es un enlace sencillo, átomo de oxígeno, átomo de azufre, SO, SO₂, NR⁴ o CONR⁴; y

R⁴ es un átomo de hidrógeno o alquilo C₁₋₄.

[3] El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con [1] o [2], o su sal farmacéuticamente aceptable, donde R² es alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente con de 1 a 3 grupos que pueden ser idénticos o diferentes seleccionados entre hidroxilo, átomo de halógeno, alcoxi C₁₋₆ y haloalcoxi C₁₋₆.

[4] El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], o su sal farmacéuticamente aceptable, donde A es un anillo de benceno o anillo de piridina.

[5] El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con [4], o su sal farmacéuticamente aceptable, donde A es un anillo de benceno.

[6] El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], o su sal farmacéuticamente aceptable, donde L² es metileno.

[7] El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6], o su sal farmacéuticamente aceptable, donde R² es alquilo C₁₋₄, hidroxialquilo C₁₋₄ o alcoxi C₁₋₄-alquilo C₁₋₄.

[8] El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [7], o su sal farmacéuticamente aceptable, donde L¹ es alquileo C₁₋₃ y R¹ es un átomo de hidrógeno o alquilo C₁₋₃.

[9] El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [8], o su sal farmacéuticamente aceptable, donde todos los enlaces descritos por

[Quím. 3]

representan un enlace simple, o todos los enlaces descritos por

[Quím. 4]

representan un doble enlace.

[10] El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [9], o su sal farmacéuticamente aceptable, donde R¹ es un átomo de hidrógeno o metilo.

[11] El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con [1], o su sal farmacéuticamente aceptable, donde

L¹ es metileno;

L² es metileno;

R¹ es un átomo de hidrógeno o metilo;

R² es alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₃-alquilo C₂₋₄ o alquilo C₂₋₆ sustituido con de 1 a 4 grupos hidroxilo, donde dos o más grupos hidroxilo están unidos a diferentes átomos de carbono;

R³ es un átomo de hidrógeno, alquilo C₁₋₃, alcoxi C₁₋₃ o un átomo de halógeno;

X¹ es enlace sencillo, átomo de oxígeno, NR⁴ o CONR⁴;

R⁴ es un átomo de hidrógeno o alquilo C₁₋₃;

A es un anillo de benceno o anillo de piridina; y

todos los enlaces descritos por

[Quím. 5]

representan un enlace simple, o todos los enlaces descritos por

[Quím. 6]

representan un doble enlace.

[12] Una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [11], o su sal farmacéuticamente aceptable.

[13] La composición farmacéutica de acuerdo con [12] donde la composición farmacéutica es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno como un componente oleoso, Span (marca registrada) 85 (trioleato de sorbitán) y Poloxámero 188.

[14] La composición farmacéutica de acuerdo con [12] donde la composición farmacéutica es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno como un componente oleoso, L- α -fosfatidilcolina y Poloxámero 188.

[15] La composición farmacéutica de acuerdo con [13] o [14] donde la emulsión de aceite en agua comprende microgotas con un tamaño medio de partícula de 10-1000 nm $\pm$ 10 nm.

[16] La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de [12] a [15], que comprende además un antígeno.

[17] La composición farmacéutica de acuerdo con [16], donde el antígeno es un antígeno derivado de un patógeno o es un antígeno tumoral.

[18] La composición farmacéutica de acuerdo con [16] o [17], donde el antígeno es un péptido o una proteína.

[19] Un adyuvante de vacuna que comprende un compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [11], o su sal farmacéuticamente aceptable.

[20] Un compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [11] o su sal farmacéuticamente aceptable para su uso en terapia.

[21] Un compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [11] o su sal farmacéuticamente aceptable para su uso como un adyuvante de vacuna.

[22] Un compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones [1] a [11] o su sal farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer.

[23] Un método para potenciar la actividad inmunoestimulante de un antígeno que comprende un paso de administración de una cantidad eficaz de un compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [11] o su sal farmacéuticamente aceptable a un mamífero que lo necesite.

[24] Uso de un compuesto de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [11] o su sal farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un adyuvante de vacuna.

Breve descripción de los dibujos

[fig. 1] Inducción de respuestas de linfocitos T específicos para el antígeno amplificadas por las emulsiones de los Ejemplos 6, 7 y 8.

[fig. 2] Inducción de respuestas de linfocitos T CD8 específicos para el antígeno amplificadas por las emulsiones de los Ejemplos 6, 7 y 8.

[fig.3] Inducción de frecuencias elevadas de linfocitos T CD4 multifuncionales específicos para el antígeno por las emulsiones de los Ejemplos 6, 7 y 8. GM-CSF+ representado como G+, IFN- γ + representado como g+, IL-2+ representado como 2+, y TNF- α + representado como T+, GM-CSF- representado como G-, IFN- γ - representado como g-, IL-2- representado como 2-, y TNF- α - representado como T-.

[fig.4] Inducción de frecuencias elevadas de linfocitos T CD4 multifuncionales específicos para el antígeno por las emulsiones de los Ejemplos 6, 7 y 8. GM-CSF+ representado como G+, IFN- γ + representado como g+, IL-2+ representado como 2+, y TNF- α + representado como T+, GM-CSF- representado como G-, IFN- γ - representado como g-, IL-2- representado como 2-, y TNF- α - representado como T-.

[fig.5] Inducción de títulos robustos de IgG e IgG2c específicas para el antígeno en ratones por las emulsiones de los Ejemplos 6, 7 y 8.

[fig. 6] Inducción de respuestas de linfocitos T específicos para el antígeno amplificadas por la emulsión del Ejemplo 9.

[fig.7] Inducción de respuestas de linfocitos T CD8 específicos para el antígeno amplificadas por la emulsión del Ejemplo 9.

[fig.8] Inducción de frecuencias elevadas de linfocitos T CD4 multifuncionales específicos para el antígeno por la emulsión del Ejemplo 9.

[fig.9] Inducción de frecuencias elevadas de linfocitos T CD8 multifuncionales específicos para el antígeno por la emulsión del Ejemplo 9. GM-CSF+ representado como G+, IFN- γ + representado como g+, IL-2+ representado como 2+, y TNF- α + representado como T+, GM-CSF- representado como G-, IFN- γ - representado como g-, IL-2- representado como 2-, y TNF- α - representado como T-.

[fig.10] Inducción de títulos robustos de IgG específicas para el antígeno en ratones por la emulsión del Ejemplo 9.

[fig.11] Inducción de títulos robustos de IgG2a específicas para el antígeno en ratones por la emulsión del Ejemplo 9.

[fig.12] Inducción de respuestas citotóxicas robustas específicas para el antígeno en ratones por la emulsión del Ejemplo 9.

Descripción de las realizaciones

- La presente invención incluye cualesquiera sustancias con actividad óptica y racémicas que tengan la actividad fisiológica descrita a continuación cuando el compuesto de fórmula (1) definido anteriormente tiene uno o más átomos de carbono asimétricos y, por lo tanto, existe como una forma con actividad óptica o una forma racémica. La preparación de tal compuesto con actividad óptica se puede llevar a cabo mediante una técnica estándar de química orgánica que es muy conocida en dicho campo, por ejemplo, síntesis a partir de un material de partida con actividad óptica o resolución de una sustancia racémica. La actividad fisiológica en la presente invención se puede evaluar con una técnica experimental estándar que se describe más adelante.
- En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable que es un único isómero óptico que está en un exceso enantiomérico (% ee) de $\geq 95\%$, $\geq 98\%$ o $\geq 99\%$. En una realización, el único isómero óptico está presente en un exceso enantiomérico (% ee) de $\geq 99\%$.
- El compuesto de la fórmula anterior (1) puede existir en forma de un compuesto que no es un solvato o un solvato tal como un hidrato.
- La forma del compuesto de fórmula (1) no está limitada, y puede estar en una forma amorfa o en una forma cristalina específica.
- El término «átomo de halógeno», tal como se utiliza en la presente, incluye un átomo de flúor, átomo de cloro, átomo de bromo y átomo de yodo o, por ejemplo, un átomo de flúor y un átomo de cloro.
- El término «alquileo», tal como se utiliza en la presente, incluye un grupo alquileo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquileo específicos incluyen, sin carácter limitante, metileno, etileno, *n*-propileno y *n*-butileno.
- El término «alquilo», tal como se utiliza en la presente, incluye un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo específicos incluyen, sin carácter limitante, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y *tert*-butilo.
- El término «haloalquilo», tal como se utiliza en la presente, denota un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que está sustituido con de 1 a 5 átomos de halógeno que son idénticos o diferentes. Los grupos haloalquilo específicos incluyen, sin carácter limitante, difluorometilo, trifluorometilo, triclorometilo, difluoroetilo, trifluoroetilo, tetrafluoroetilo y pentafluoroetilo.
- El término «alcoxi», tal como se utiliza en la presente, incluye un grupo alcoxi de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alcoxi específicos incluyen, sin carácter limitante, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxilo, butoxi, isobutoxi, *tert*-butoxi, pentoxi e isopentoxi.
- El término «haloalcoxi», tal como se utiliza en la presente, denota un grupo alcoxi de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 6 átomos de carbono que está sustituido con de 1 a 5 átomos de halógeno que son idénticos o diferentes. Los grupos haloalcoxi específicos incluyen, sin carácter limitante, difluorometoxi, trifluorometoxi, triclorometoxi, difluoroetoxi, trifluoroetoxi, tetrafluoroetoxi y pentafluoroetoxi.
- La expresión «carbociclo aromático», tal como se utiliza en la presente, incluye carbociclos aromáticos monocíclicos, por ejemplo, un anillo de benceno.
- El término «heterociclo aromático», tal como se utiliza en la presente, incluye un heterociclo aromático monocíclico de 5 a 6 miembros que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en de 1 a 4 átomos de nitrógeno, un átomo de oxígeno y un átomo de azufre en el anillo. Los heterociclos aromáticos específicos incluyen, sin carácter limitante, un anillo de pirrol, un anillo de tiofeno, un anillo de furano, un anillo de piridina y un anillo de pirimidina.
- Los grupos variables en la fórmula (1) pueden tener los siguientes valores. Tales valores se pueden utilizar combinados con cualquiera de las definiciones, reivindicaciones (por ejemplo, la reivindicación 1) o realizaciones descritas en la presente para proporcionar realizaciones adicionales de la invención.
- En algunas realizaciones, L^1 en la fórmula (1) es alquileo C_{1-4} . En algunas realizaciones, L^1 en la fórmula (1) es alquileo C_{1-3} . En algunas realizaciones, L^1 en la fórmula (1) es metileno o etileno. En algunas realizaciones, L^1 en la fórmula (1) es metileno.
- En algunas realizaciones, L^2 en la fórmula (1) es alquileo C_{1-4} . En algunas realizaciones, L^2 en la fórmula (1) es metileno o etileno. En algunas realizaciones, L^2 en la fórmula (1) es metileno.
- En algunas realizaciones, X^1 en la fórmula (1) es un enlace sencillo, un átomo de oxígeno, átomo de azufre, grupo sulfinilo, grupo sulfonilo, NR^4 o $CONR^4$ donde R^4 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-4} . En algunas

realizaciones, X^1 en la fórmula (1) es un enlace sencillo, un átomo de oxígeno, NR^4 o $CONR^4$. En algunas realizaciones, X^1 en la fórmula (1) es un átomo de oxígeno.

5 En algunas realizaciones, R^4 en la fórmula (1) es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-3} . En algunas realizaciones, R^4 en la fórmula (1) es un átomo de hidrógeno o grupo metilo.

En algunas realizaciones, m en la fórmula (1) es 1. En algunas realizaciones, m en la fórmula (1) es 0.

10 En algunas realizaciones, los enlaces descritos por
[Quím. 7]

son independientemente un enlace sencillo o un doble enlace. En algunas realizaciones, los enlaces descritos por
[Quím. 8]

15 son todos enlaces sencillos o todos dobles enlaces. En algunas realizaciones, los enlaces descritos por
[Quím. 9]

son todos enlaces sencillos.

20 En algunas realizaciones, R^1 en la fórmula (1) es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-3} . En algunas realizaciones, R^1 en la fórmula (1) es un átomo de hidrógeno o grupo metilo. En algunas realizaciones, R^1 en la fórmula (1) es metilo.

25 En algunas realizaciones, R^2 en la fórmula (1) es un grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene 1 a 6 átomos de carbono. En algunas realizaciones, R^2 en la fórmula (1) es un grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene 1 a 4 átomos de carbono.

30 En cualquier realización en la que está sustituido un grupo alquilo, dicho alquilo puede estar sustituido con de 1 a 4 sustituyentes que son idénticos o diferentes seleccionados entre el siguiente grupo: un grupo hidroxilo, átomo de halógeno, grupo alquilo C_{1-6} , grupo haloalquilo C_{1-6} , grupo alcoxi C_{1-6} , grupo haloalcoxi C_{1-6} , grupo amino que puede estar sustituido con uno o dos grupos alquilo C_{1-6} y grupo carboxi.

35 En cualquier realización donde está sustituido un grupo alquilo, dicho alquilo puede estar sustituido de 1 a 3 sustituyentes que pueden ser idénticos o diferentes seleccionados entre un grupo hidroxilo, átomo de halógeno, grupo alcoxi C_{1-6} y grupo haloalcoxi C_{1-6} , y más preferentemente grupo hidroxilo o grupo alcoxi C_{1-4} .

40 En algunas realizaciones, R^2 en la fórmula (1) es un grupo alquilo C_{1-6} , un grupo alquilo C_{2-4} sustituido con un grupo alcoxi C_{1-3} , o un grupo alquilo C_{2-6} sustituido con de 1 a 4 grupos hidroxilo, siempre que los grupos hidroxilo estén unidos a diferentes átomos de carbono cuando el grupo alquilo C_{2-6} esté sustituido con varios grupos hidroxilo. En algunas realizaciones, R^2 en la fórmula (1) es un grupo alquilo C_{1-6} . En algunas realizaciones, R^2 en la fórmula (1) es un grupo alquilo C_{2-4} sustituido con un grupo alcoxi C_{1-3} . En algunas realizaciones, R^2 en la fórmula (1) es un grupo alquilo C_{2-6} sustituido con de 1 a 4 grupos hidroxilo, siempre que los grupos hidroxilo estén unidos a diferentes átomos de carbono cuando el grupo alquilo C_{2-6} esté sustituido con varios grupos hidroxilo. En algunas realizaciones, R^2 en la fórmula (1) es *n*-butilo, 2-metoxietilo o 2,3-dihidroxi-prop-1-ilo. En algunas realizaciones, R^2 en la fórmula (1) es *n*-butilo.
45 En algunas realizaciones, R^2 en la fórmula (1) es 2-metoxietilo. En algunas realizaciones, R^2 en la fórmula (1) es 2,3-dihidroxi-prop-1-ilo.

50 En algunas realizaciones, «A» en la fórmula (1) es un anillo de benceno o un heterociclo aromático monocíclico que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en de 1 a 4 átomos de nitrógeno, un átomo de oxígeno y un átomo de azufre en el anillo. En algunas realizaciones, «A» en la fórmula (1) es un anillo de benceno, anillo de piridina, anillo de pirrol, tiofeno, anillo de furano o anillo de pirimidina. En algunas realizaciones, «A» en la fórmula (1) es un anillo de benceno o un anillo de piridina. En algunas realizaciones, «A» en la fórmula (1) es un anillo de benceno.

55 En algunas realizaciones, R^3 en la fórmula (1) es átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, un grupo alquilo C_{1-6} o grupo alcoxi C_{1-6} . En algunas realizaciones, R^3 en la fórmula (1) es un átomo de hidrógeno, átomo de flúor, átomo de cloro, un grupo alquilo C_{1-3} o grupo alcoxi C_{1-3} . En algunas realizaciones, R^3 en la fórmula (1) es un átomo de hidrógeno, átomo de flúor, grupo metilo o grupo metoxi. En algunas realizaciones, R^3 en la fórmula (1) es un átomo de hidrógeno.

60 En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable donde
 L^1 y L^2 son metileno,
 R^1 es un átomo de hidrógeno o grupo metilo,

R² es un grupo alquilo C₁₋₆, grupo alquilo C₂₋₄ sustituido con un grupo alcoxi C₁₋₃, o un grupo alquilo C₂₋₆ sustituido con de 1 a 4 grupos hidroxilo, siempre que los grupos hidroxilo estén unidos a diferentes átomos de carbono cuando el grupo alquilo C₂₋₆ esté sustituido con varios grupos hidroxilo,

R³ es un átomo de hidrógeno, grupo alquilo C₁₋₃, grupo alcoxi C₁₋₃ o un átomo de halógeno,

5 X¹ es un enlace sencillo, un átomo de oxígeno o NR⁴ donde R⁴ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₃,

A es un anillo de benceno o anillo de piridina, y

todos los enlaces descritos por

[Quím. 10]

=====

10 representan un enlace simple, o todos los enlaces descritos por

[Quím. 11]

=====

representan un doble enlace.

15 En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable donde

L¹ y L² son metileno,

R¹ es un átomo de hidrógeno o grupo metilo,

20 R² es un grupo alquilo C₁₋₆, grupo alquilo C₂₋₄ sustituido con un grupo alcoxi C₁₋₃, o un grupo alquilo C₂₋₆ sustituido con de 1 a 4 grupos hidroxilo, siempre que los grupos hidroxilo estén unidos a diferentes átomos de carbono cuando el grupo alquilo C₂₋₆ esté sustituido con varios grupos hidroxilo,

R³ es un átomo de hidrógeno, grupo alquilo C₁₋₃, grupo alcoxi C₁₋₃ o un átomo de halógeno,

X¹ es un enlace sencillo, un átomo de oxígeno o NR⁴ donde R⁴ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₃,

A es un anillo de benceno o anillo de piridina, y

25 todos los enlaces descritos por

[Quím. 12]

=====

representan un enlace simple, o todos los enlaces descritos por

[Quím. 13]

=====

30 representan un doble enlace.

En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable donde

35 L¹ y L² son metileno,

R¹ es un grupo metilo,

R² es un grupo alquilo C₁₋₆, grupo alquilo C₂₋₄ sustituido con un grupo alcoxi C₁₋₃, o un grupo alquilo C₂₋₆ sustituido con de 1 a 4 grupos hidroxilo, siempre que los grupos hidroxilo estén unidos a diferentes átomos de carbono cuando el grupo alquilo C₂₋₆ esté sustituido con varios grupos hidroxilo,

40 R³ es un átomo de hidrógeno,

X¹ es un átomo de oxígeno,

A es un anillo de benceno, y

todos los enlaces descritos por

[Quím. 14]

=====

45 representan un enlace sencillo.

En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable donde

50 L¹ y L² son metileno,

R¹ es un grupo metilo,

R² es *n*-butilo, 2-metoxietilo o 2,3-dihidroxiprop-1-ilo,

R³ es un átomo de hidrógeno,

X¹ es un átomo de oxígeno,

55 A es un anillo de benceno, y

todos los enlaces descritos por

[Quím. 15]

=====

representan un enlace sencillo.

60 En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) que es 6-amino-2-butoxi-9-[4-(((4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa -4,8,12,16,20,24-hexen-1-il)(metil)amino}metil)bencil]-9H-purin-8-ol o su sal farmacéuticamente aceptable. En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) que es 6-amino-2-butoxi-9-[4-(((4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa -

4,8,12,16,20,24-hexen-1-il](metil)amino}metil)bencil]-9*H*-purin-8-ol. En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) que es una sal farmacéuticamente aceptable de 6-amino-2-butoxi-9-[4-(((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17, 21,25-hexametilhexacosa -4,8,12,16,20,24-hexen-1-il](metil)amino}metil)bencil]-9*H*-purin-8-ol.

5 En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) que es 6-amino-9-[4-(((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexen-1-il](metil)amino}metil)bencil]-2-(2-metoxietoxi)-9*H*-purin-8-ol o su sal farmacéuticamente aceptable. En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) que es 6-amino-9-[4-(((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexen-1-il](metil)amino}metil)bencil]-2-(2-metoxietoxi)-9*H*-purin-8-ol. En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) que es una sal farmacéuticamente aceptable de 6-amino-9-[4-(((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa -4,8,12,16,20,24-hexen-1-il](metil)amino}metil)bencil]-2-(2-metoxietoxi)-9*H*-purin-8-ol.

15 En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) que es 3-((6-amino-9-[4-(((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexen-1-il](metil)amino}metil)bencil]-8-hidroxi-9*H*-purin-2-il)-oxi) propano-1,2-diol o su sal farmacéuticamente aceptable. En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) que es 3-((6-amino-9-[4-(((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexen-1-il](metil)amino}metil)bencil]-8-hidroxi-9*H*-purin-2-il)-oxi) propano-1,2-diol. En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) que es una sal farmacéuticamente aceptable de 3-((6-amino-9-[4-(((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,1 2,16,20,24-hexen-1-il](metil)amino}metil)bencil]-8-hidroxi-9*H*-purin-2-il)-oxi) propano-1,2-diol.

25 La sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula (1) incluye, por ejemplo, sales de adición de ácido o sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen una sal con un ácido inorgánico u orgánico tal como clorhidrato, bromhidrato, sulfato, trifluoroacetato, citrato y maleato. Las sales de adición de base incluyen una sal de un metal alcalino tal como sal de sodio y sal de potasio, una sal de un metal alcalinotérreo tal como sal de calcio y una sal de amonio.

30 En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable donde la sal farmacéuticamente aceptable es un clorhidrato, bromhidrato, sulfato, trifluoroacetato, citrato, maleato, sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio o sal de amonio. En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de clorhidrato, bromhidrato, sulfato, trifluoroacetato, citrato o maleato. En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de sodio, potasio, calcio o amonio.

Proceso para preparar el compuesto de fórmula (1)

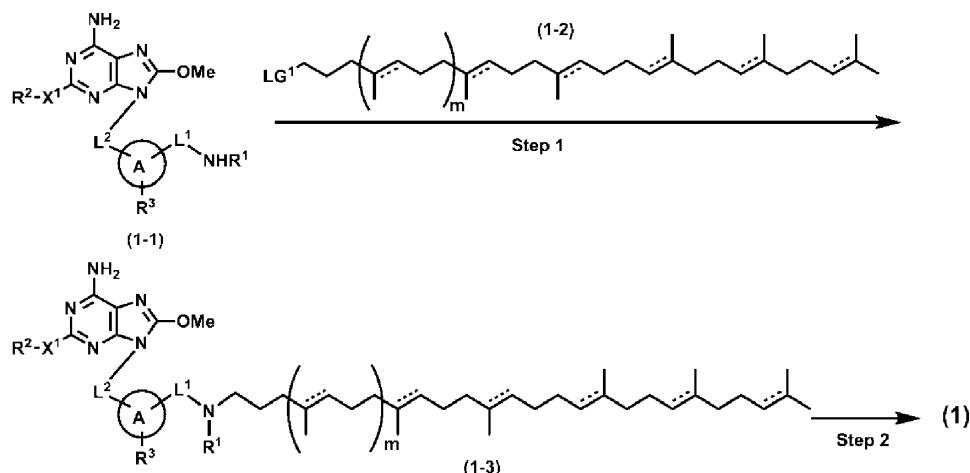
40 Los compuestos de fórmula (1) se pueden preparar utilizando compuestos conocidos como material de partida de acuerdo con los siguientes procesos.

Los materiales de partida se pueden utilizar en forma de una sal. Los siguientes procesos son solo ejemplos, y los presentes compuestos también se pueden preparar mediante otros procesos en función del conocimiento de un experto.

Proceso 1

Por ejemplo, el compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable se puede preparar de acuerdo con el siguiente proceso.

[Quim. 16]

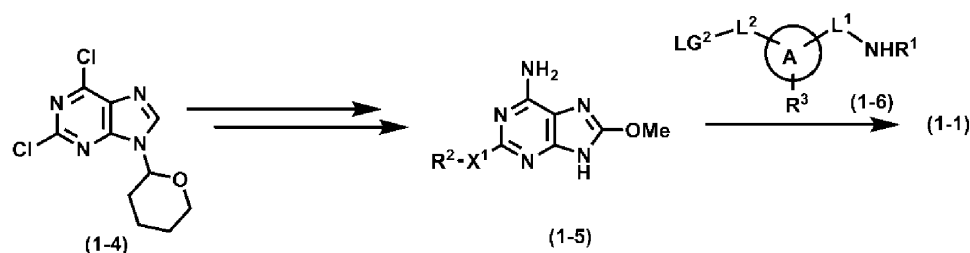


Donde A, L¹, L², X¹, R¹, R², R³ y m son como se han definido anteriormente, y LG¹ significa un grupo saliente.

Paso 1

Los compuestos de fórmula (1-1) se pueden preparar de acuerdo con el documento WO 2008/114817. Específicamente, se pueden preparar haciendo reaccionar los Compuestos de fórmula (1-5) [preparados a partir de 2,6-dicloro-9-(tetrahydro-2H-piran-2-yl)-9H-purina (fórmula (1-4)) con Compuestos de fórmula (1-6) en presencia de una base.

[Quim. 17]



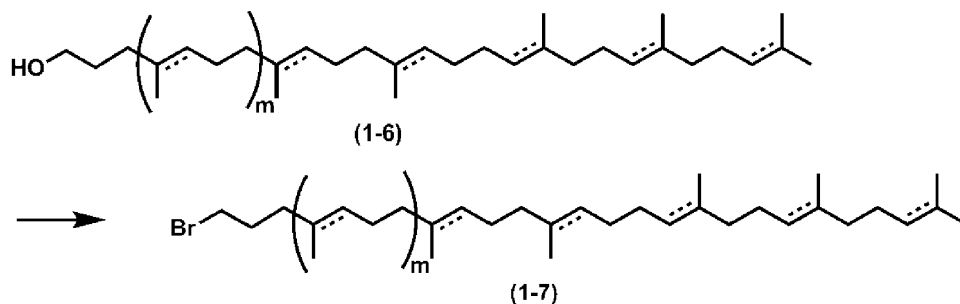
En el esquema anterior, A, L¹, L², X¹, R¹, R² y R³ son como se han definido anteriormente, y LG² es un grupo saliente. Los compuestos de fórmula (1-3) se pueden preparar haciendo reaccionar los Compuestos de fórmula (1-1) con los Compuestos de fórmula (1-2) en un disolvente inerte en presencia de una base.

La base utilizada en la presente incluye una base orgánica o una base inorgánica de las que puede disponer el experto en la técnica, por ejemplo, una base orgánica tal como *N*-metilmorfolina, trietilamina, diisopropiletilamina, tributilamina, 1,8-diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno, 1,4-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno, piridina o dimetilaminopiridina; y una base inorgánica tal como hidrogenocarbonato de sodio, hidrogenocarbonato de potasio, carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de cesio, hidróxido de sodio o hidruro de sodio. La cantidad de la base utilizada aquí es generalmente de 0,1 a 100 moles, o como alternativa de 1 a 3 moles, por 1 mol de Compuesto (1-1).

El disolvente inerte utilizado en la presente incluye, por ejemplo, un disolvente de tipo éter tal como tetrahidrofurano, éter dietílico, 1,4-dioxano o 1,2-dimetoxietano; un disolvente hidrocarbonado tal como hexano, heptano, tolueno, benceno o xileno; y un disolvente no protónico tal como acetonitrilo, *N,N*-dimetilformamida, *N*-metilpirrolidona o sulfóxido dimetilo; o cualquier mezcla adecuada de estos. La temperatura de reacción está, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 120 °C.

El grupo saliente LG¹ en los Compuestos de fórmula (1-2) en el Paso 1 incluye, sin carácter limitante, un átomo de halógeno o un grupo alquilsulfonilo o un grupo arilsulfonilo. Por ejemplo, los compuestos de fórmula (1-2) se pueden preparar de acuerdo con la referencia (*Org. Biomol. Chem.* 2011, 9, 4367) cuando LG¹ es un grupo metanosulfonilo. Cuando LG¹ es un halógeno u otros grupos salientes, los Compuestos de fórmula (1-2) también se pueden preparar a partir de un intermedio descrito en la referencia en condiciones convencionales con las que estará familiarizado un experto (*Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 11*, Química orgánica y bioorgánica, (7), 889-93 (1995)). Por ejemplo, los Compuestos de fórmula (1-2) donde LG¹ es bromo (Fórmula (1-7)) se pueden sintetizar a partir de un compuesto hidróxido de Fórmula (1-6) con tetrabromuro de carbono y trifenilfosfina en un disolvente de tipo diclorometano o éter, tal como se muestra en el siguiente esquema.

[Quim. 18]



El grupo saliente LG² en los Compuestos de fórmula (1-6) es, por ejemplo, halógeno, grupo alquilsulfonilo o arilsulfonilo opcionalmente sustituido.

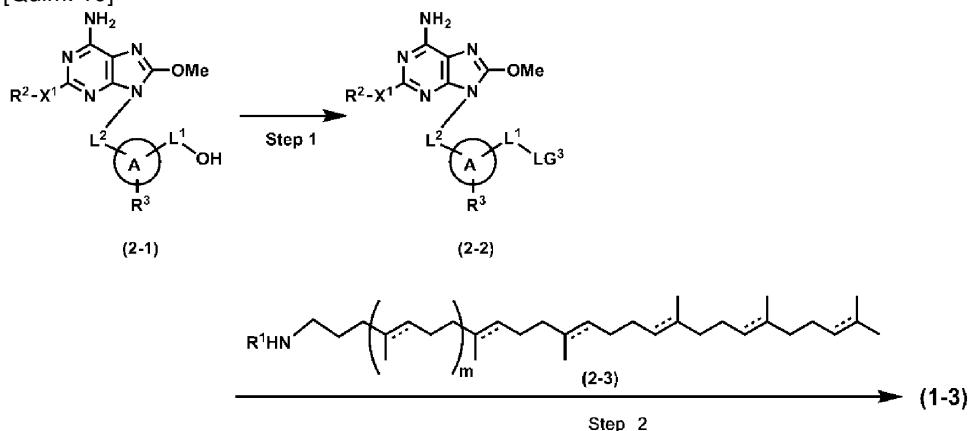
5 Paso 2

Los compuestos de fórmula (1) se pueden preparar haciendo reaccionar los Compuestos de fórmula (1-3) en condiciones ácidas. El ácido utilizado puede ser, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido trifluoroacético. La cantidad del ácido utilizado puede ser, por ejemplo, de 0,1 equivalentes molares respecto a un exceso de 20 moles por 1 mol del Compuesto de fórmula (1-3). El ácido clorhídrico se puede utilizar como una solución acuosa, o como una solución en un solvente orgánico tal como metanol o 1,4-dioxano. El disolvente utilizado en el Paso 2 incluye, por ejemplo, un disolvente de tipo éter tal como tetrahidrofurano, éter dietílico, 1,4-dioxano o 1,2-dimetoxietano; un disolvente halogenado tal como diclorometano, cloroformo o 1,2-dicloroetano; y un disolvente alcohólico tal como metanol, etanol o isopropanol; o una mezcla de estos. La temperatura de reacción se selecciona preferentemente, sin carácter limitante, del intervalo de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 60 °C.

15 Proceso 2

Los compuestos de fórmula (1-3) o sus sales también se pueden preparar de acuerdo con el siguiente proceso.

[Quim. 19]



Donde A, L¹, L², X¹, R¹, R², R³ y m son tal como se han definido anteriormente, y LG³ significa un grupo saliente.

25 Paso 1

Los compuestos de fórmula (2-1) se pueden preparar de acuerdo con el documento WO 2008/114817. El grupo saliente LG³ en los Compuestos de fórmula (2-2) incluye, sin carácter limitante, átomo de halógeno, grupo alquilsulfonilo y grupo arilsulfonilo. Los compuestos de fórmula (2-2) se pueden preparar, por ejemplo, haciendo reaccionar los Compuestos de fórmula (2-1) con cloruro de metanosulfonilo, cloruro de *p*-toluenosulfonilo o similares en presencia de una base tal como trietilamina, diisopropilamina, piridina, dimetilaminopiridina, carbonato de sodio o carbonato de potasio.

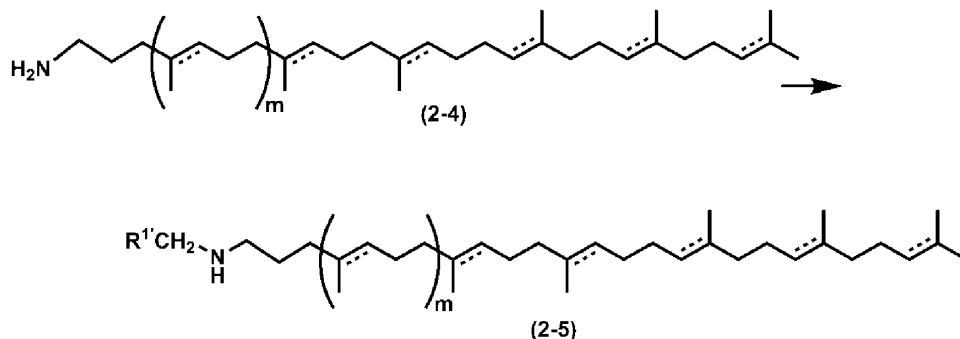
30 Paso 2

Los compuestos de fórmula (1-3) se pueden preparar a partir de Compuestos de fórmula (2-2) y Compuestos de fórmula (2-3) utilizando las mismas condiciones utilizadas en el Paso 1 en el Proceso 1.

Los Compuestos de fórmula (2-3) donde m es 0 se pueden preparar de acuerdo con un método sintético muy conocido por un experto (por ejemplo, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 1508; *Lipids*, 2005, 40, 729; *J. Org. Chem.* 1996, 61, 3849), incluida la aminación reductora de 1,1',2'-tris-nor-escualenoaldehído. Los Compuestos de fórmula (2-3) donde m es 1 se pueden preparar de acuerdo con un método muy conocido por un experto (por ejemplo, *Org. Biomol. Chem.* 2011, 9, 4367).

Además, los Compuestos de fórmula (2-3) donde R^1 es un grupo alquilo (es decir, los Compuestos de fórmula (2-5) en el esquema que se muestra a continuación) se pueden preparar, por ejemplo, mediante el proceso que se muestra en el siguiente esquema.

[Quim. 20]

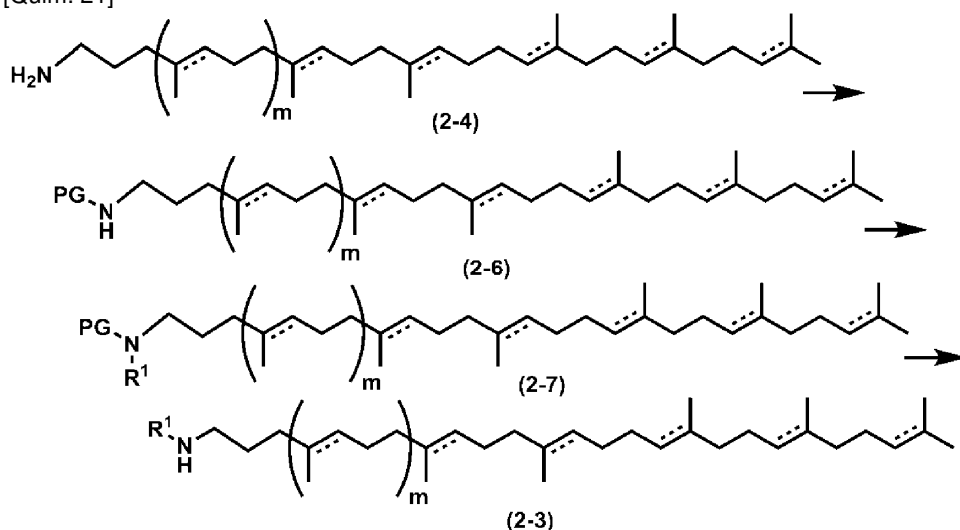


Donde m es como se ha definido anteriormente, y R^1CH_2 corresponde a R^1 tal como se ha definido anteriormente.

Los Compuestos de fórmula (2-5) se pueden preparar a partir de Compuestos de fórmula (2-4) y un compuesto aldehído ($R'CHO$) en condiciones de aminación reductora muy conocidas por un experto en la técnica.

Además, los Compuestos de fórmula (2-3) se pueden preparar de acuerdo con el siguiente esquema, es decir, cuando un Compuesto de fórmula (2-4) se convierte en un Compuesto de fórmula (2-6) protegiendo el grupo amino en este, el Compuesto resultante de fórmula (2-6) se alquila a continuación en condiciones muy conocidas por un experto para proporcionar un Compuesto de fórmula (2-7), y a continuación el Compuesto resultante de fórmula (2-7) se desprotege para preparar un Compuesto de fórmula (2-3).

[Quim. 21]



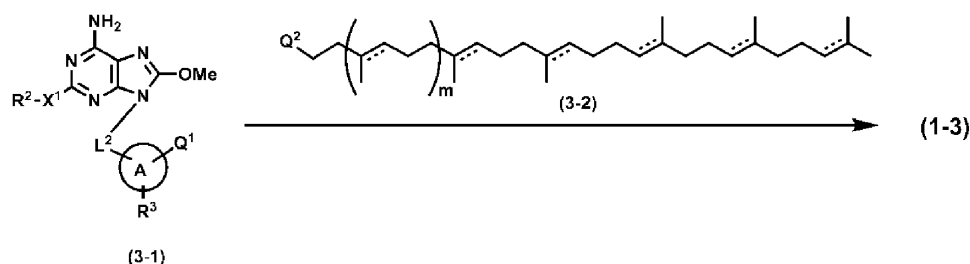
Donde R^1 es tal como se ha definido anteriormente, y PG significa un grupo protector adecuado para proteger un grupo amino.

El grupo protector PG puede ser cualquier grupo protector muy conocido por un experto tal como acetilo, trifluoroacetilo, Boc o Fmoc, y el paso de protección y desprotección se puede realizar de acuerdo con las condiciones conocidas por el experto, o como se describe en un manual de referencia adecuado (por ejemplo, Protective Groups in Organic Synthesis, 3.^a edición (John Wiley & Sons, Inc. 2002)).

Proceso 3

Los compuestos de fórmula (1-3) o sus sales también se pueden preparar de acuerdo con el siguiente proceso.

[Quim. 22]



Donde A, L¹, L², X¹, R¹, R², R³ y m son tal como se han definido anteriormente, y (1) Q¹ es -L¹NHR¹ y Q² es CHO, o (2) Q¹ es -L¹-CHO donde L¹ está ausente o es un alquileo y -L¹-CH₂- corresponde a -L¹-, y Q² es -CH₂NHR¹.

Los Compuestos de fórmula (1-3) se pueden preparar condensando Compuestos de fórmula (3-1) y Compuestos de fórmula (3-2) en condiciones de aminación reductora muy conocidas por un experto.

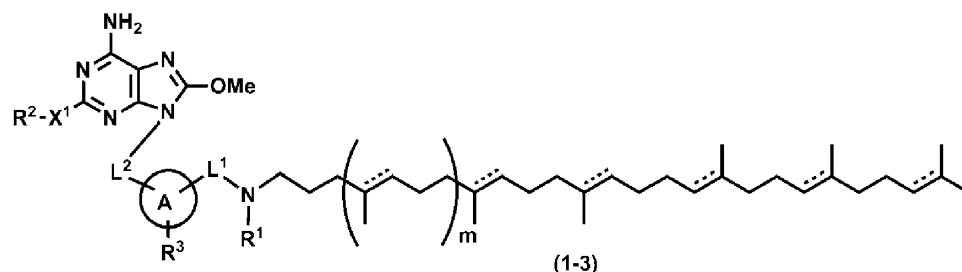
Los compuestos de fórmula (3-1) se pueden preparar de acuerdo con un proceso convencional (por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 2008/114817). Además, los compuestos de fórmula (3-1) donde Q¹ es -L¹-CHO se pueden preparar oxidando Compuestos de fórmula (2-1) preparados en el Proceso 2 con un agente de oxidación tal como dióxido de manganeso.

En cualquiera de los pasos preparativos descritos en la presente, si es necesario proteger un grupo funcional específico en estos (tal como un grupo hidroxilo y grupo amino), el grupo funcional se puede proteger con uno o más grupos protectores adecuados y posteriormente desprotegerse de manera adecuada según de acuerdo con un método muy conocido por un experto, por ejemplo, tal como se describe en «Protective Groups in Organic Chemistry», editado por J.W.F. McOmie, Plenum Press (1973) y «Protective Groups in Organic Synthesis», 3.^a edición, T.W. Greene y P.G.M. Wuts, Wiley-Interscience (1999).

Los intermedios descritos anteriormente son útiles en la preparación de compuestos de fórmula (1).

En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1-3) o su sal:

[Quim. 23]



donde

L¹ y L² son independientemente alquileo;

R¹ es un átomo de hidrógeno o alquilo;

R² es alquilo sustituido opcionalmente;

R³ es un átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, alquilo o alcoxi;

X¹ es un enlace sencillo, átomo de oxígeno, átomo de azufre, SO, SO₂, NR⁴ o CONR⁴;

R⁴ es un átomo de hidrógeno o alquilo;

A es carbociclo aromático monocíclico, o heterociclo aromático de 5 o 6 miembros que incluye de 1 a 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en de 1 a 4 átomos de nitrógeno, un átomo de oxígeno y un átomo de azufre;

m es 0 o 1; y

un enlace descrito por

[Quím. 24]

representa independientemente un enlace sencillo o un enlace doble.

En una realización, se proporciona un compuesto de fórmula (1-3) o una sal de este, donde

L¹ y L² son metileno,

R¹ es un átomo de hidrógeno o grupo metilo,

R² es un grupo alquilo C₁₋₆, grupo alquilo C₂₋₄ sustituido con un grupo alcoxi C₁₋₃, o un grupo alquilo C₂₋₆ sustituido con de 1 a 4 grupos hidroxilo, siempre que los grupos hidroxilo estén unidos a diferentes átomos de carbono cuando el grupo alquilo C₂₋₆ esté sustituido con varios grupos hidroxilo,

R³ es un átomo de hidrógeno, grupo alquilo C₁₋₃, grupo alcoxi C₁₋₃ o un átomo de halógeno,

X¹ es un enlace sencillo, un átomo de oxígeno o NR⁴ donde R⁴ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₃,
A es un anillo de benceno o anillo de piridina, y
todos los enlaces descritos por
[Quím. 25]

5
representan un enlace simple, o todos los enlaces descritos por
[Quím. 26]

representan un doble enlace.

10 En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1-3) o su sal
donde
L¹ y L² son metileno,
R¹ es un átomo de hidrógeno o grupo metilo,
15 R² es un grupo alquilo C₁₋₆, grupo alquilo C₂₋₄ sustituido con un grupo alcoxi C₁₋₃, o un grupo alquilo C₂₋₆ sustituido con
de 1 a 4 grupos hidroxilo, siempre que los grupos hidroxilo estén unidos a diferentes átomos de carbono cuando el
grupo alquilo C₂₋₆ esté sustituido con varios grupos hidroxilo,
R³ es un átomo de hidrógeno, grupo alquilo C₁₋₃, grupo alcoxi C₁₋₃ o un átomo de halógeno,
20 X¹ es un enlace sencillo, un átomo de oxígeno o NR⁴ donde R⁴ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₃,
A es un anillo de benceno o anillo de piridina, y
todos los enlaces descritos por
[Quím. 27]

representan un enlace simple, o todos los enlaces descritos por
25 [Quím. 28]

representan un doble enlace.

30 En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1-3) o su sal donde
L¹ y L² son metileno,
R¹ es un átomo de hidrógeno o grupo metilo,
R² es un grupo alquilo C₁₋₆, grupo alquilo C₂₋₄ sustituido con un grupo alcoxi C₁₋₃, o un grupo alquilo C₂₋₆ sustituido con
de 1 a 4 grupos hidroxilo, siempre que los grupos hidroxilo estén unidos a diferentes átomos de carbono cuando el
grupo alquilo C₂₋₆ esté sustituido con varios grupos hidroxilo,
35 R³ es un átomo de hidrógeno, grupo alquilo C₁₋₃, grupo alcoxi C₁₋₃ o un átomo de halógeno,
X¹ es un enlace sencillo, un átomo de oxígeno o NR⁴ donde R⁴ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₃,
A es un anillo de benceno o anillo de piridina, y
todos los enlaces descritos por
[Quím. 29]

40
representan enlaces simples, o todos los enlaces descritos por
[Quím. 30]

representan un doble enlace.

45 En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1-3) o su sal donde
L¹ y L² son metileno,
R¹ es un átomo de hidrógeno o grupo metilo,
R² es un grupo alquilo C₁₋₆, grupo alquilo C₂₋₄ sustituido con un grupo alcoxi C₁₋₃, o un grupo alquilo C₂₋₆ sustituido con
50 de 1 a 4 grupos hidroxilo, siempre que los grupos hidroxilo estén unidos a diferentes átomos de carbono cuando el
grupo alquilo C₂₋₆ esté sustituido con varios grupos hidroxilo,
R³ es un átomo de hidrógeno, grupo alquilo C₁₋₃, grupo alcoxi C₁₋₃ o un átomo de halógeno,
X¹ es un enlace sencillo, un átomo de oxígeno o NR⁴ donde R⁴ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₃,
A es un anillo de benceno o anillo de piridina, y
55 todos los enlaces descritos por
[Quím. 31]

representan un enlace simple, o todos los enlaces descritos por
[Quím. 32]

60
representan un doble enlace.

En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1-3) o su sal donde

L¹ y L² son metileno,
 R¹ es un grupo metilo,
 R² es un grupo alquilo C₁₋₆, grupo alquilo C₂₋₄ sustituido con un grupo alcoxi C₁₋₃, o un grupo alquilo C₂₋₆ sustituido con
 de 1 a 4 grupos hidroxilo, siempre que los grupos hidroxilo estén unidos a diferentes átomos de carbono cuando el
 grupo alquilo C₂₋₆ esté sustituido con varios grupos hidroxilo,
 R³ es un átomo de hidrógeno,
 X¹ es un átomo de oxígeno,
 A es un anillo de benceno, y
 todos los enlaces descritos por
 [Quím. 33]

 representan un enlace sencillo.

En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1-3) o su sal donde

L¹ y L² son metileno,
 R¹ es un grupo metilo,
 R² es *n*-butilo, 2-metoxietilo o 2,3-dihidroxiprop-1-ilo,
 R³ es un átomo de hidrógeno,
 X¹ es un átomo de oxígeno,
 A es un anillo de benceno, y
 todos los enlaces descritos por
 [Quím. 34]

 representan un enlace sencillo.

En una realización se proporciona
 2-butoxi-9-[[4-[[[(4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-
 hexaenil]metilamino]metil]fenil]metil]-8-metoxipurin-6-amina, o una sal de este. En una realización se proporciona
 2-butoxi-9-[[4-[[[(4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-
 hexaenil]metilamino]metil]fenil]metil]-8-metoxipurin-6-amina. En una realización, se proporciona una sal de
 2-butoxi-9-[[4-[[[(4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-
 hexaenil]metilamino]metil]fenil]metil]-8-metoxipurin-6-amina.

En una realización se proporciona
 9-[[4-[[[(4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-
 hexaenil]metilamino]metil]fenil]metil]-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-6-amina, o una sal de esta. En una realización
 se proporciona
 9-[[4-[[[(4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-
 hexaenil]metilamino]metil]fenil]metil]-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-6-amina. En una realización, se proporciona una
 sal de
 9-[[4-[[[(4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-
 hexaenil]metilamino]metil]fenil]metil]-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)purin-6-amina.

En una realización se proporciona
 (2-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi]-9-[[4-[[[(4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-
 4,8,12,16,20,24-hexaenil]metilamino]metil]fenil]metil]-8-metoxipurin-6-amina), o una sal de esta. En una realización se
 proporciona
 (2-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi]-9-[[4-[[[(4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-
 4,8,12,16,20,24-hexaenil]metilamino]metil]fenil]metil]-8-metoxipurin-6-amina). En una realización, se proporciona una
 sal de
 (2-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi]-9-[[4-[[[(4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-
 4,8,12,16,20,24-hexaenil]metilamino]metil]fenil]metil]-8-metoxipurin-6-amina).

Cuando se menciona un compuesto de fórmula (1-3) o su sal, se debe entender que no es necesario que tales sales
 sean sales farmacéuticamente aceptables. La sal del compuesto de fórmula (1-3) incluye, por ejemplo, sales de adición
 de ácido o sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen una sal con un ácido inorgánico u orgánico
 tal como clorhidrato, bromhidrato, sulfato, trifluoroacetato, citrato y maleato. Las sales de adición de base incluyen una
 sal de un metal alcalino tal como sal de sodio y sal de potasio, una sal de un metal alcalinotérreo tal como sal de calcio
 y una sal de amonio.

En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1-3) o su sal, donde la sal es un
 clorhidrato, bromhidrato, sulfato, trifluoroacetato, citrato, maleato, sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio o sal de
 amonio. En una realización, se proporciona un compuesto representado por la fórmula (1-3) o su sal, donde la sal es
 una sal de clorhidrato, bromhidrato, sulfato, trifluoroacetato, citrato o maleato. En una realización, se proporciona un
 compuesto representado por la fórmula (1-3) o su sal, donde la sal es una sal de sodio, potasio, calcio o amonio.

Los compuestos representados por la fórmula (1) o sus sales farmacéuticamente aceptables se pueden administrar como una composición farmacéutica que comprende los compuestos o sales combinados o asociados con uno o más diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

5

La formulación de la composición farmacéutica incluye líquidos inyectables, que pueden comprender emulsiones preparadas mezclando una solución acuosa y una composición oleosa, cuyos líquidos inyectables pueden esterilizarse opcionalmente.

10 La solución acuosa incluye una solución acuosa que comprende agua destilada para inyección y un tampón opcional (regulador de pH), agente estabilizante y agente isotónico. Las composiciones oleosas adecuadas incluyen escualeno y escualano.

15 Las composiciones de la presente invención pueden comprender además otros aditivos que incluyen, por ejemplo, surfactantes, reguladores del pH y antioxidantes.

Por lo tanto, en una realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable.

20 En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable combinado con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

25 En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable, donde la composición farmacéutica es una emulsión de aceite en agua.

30 En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable, donde la composición farmacéutica es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno como un componente oleoso. En una realización, la emulsión de aceite en agua comprende un 0,1-10% p/p de escualeno. En una realización, la emulsión de aceite en agua comprende un 1-5% p/p de escualeno. En una realización, la emulsión de aceite en agua comprende un 2-3% p/p de escualeno. En una realización, la emulsión de aceite en agua comprende un 2,5% ± 0,1% p/p de escualeno. En una realización, la emulsión de aceite en agua comprende un 2,5% p/p de escualeno.

35 En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable donde la composición farmacéutica es una emulsión de aceite en agua que comprende además al menos un surfactante. En una realización, la composición farmacéutica comprende uno o más surfactantes que pueden ser idénticos o diferentes seleccionados entre Span (marca registrada) 85 (trioleato de sorbitán), Poloxámero 188 y L-α-fosfatidilcolina. En una realización, el tensioactivo comprende uno o más surfactantes que pueden ser idénticos o diferentes seleccionados entre un 0,01-5% p/p de Span (marca registrada) 85 (trioleato de sorbitán) y un 0,01-5% p/p de Poloxámero 188.

40 En una realización, la L-α-fosfatidilcolina procede del huevo.

45 En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable, donde la composición farmacéutica es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno como un componente oleoso, Span (marca registrada) 85 (trioleato de sorbitán) y Poloxámero 188.

50 En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable donde la composición farmacéutica es una emulsión de aceite en agua que comprende un 0,1-10% p/p de escualeno como componente oleoso, un 0.01-5% p/p de Span (marca registrada) 85 (trioleato de sorbitán) y un 0.01-5% p/p de Poloxámero 188.

55 En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable donde la composición farmacéutica es una emulsión de aceite en agua que comprende un 2,5% p/p de escualeno como componente oleoso, un 0,23% p/p de Span (marca registrada) 85 (trioleato de sorbitán) y un 0,3% p/p de Poloxámero 188.

60 En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable, donde la composición farmacéutica es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno como un componente oleoso, L-α-fosfatidilcolina y Poloxámero 188.

65 En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable donde la composición farmacéutica es una emulsión de aceite en

agua que comprende un 0,1-10% p/p de escualeno como un componente oleoso, un 0,01-5% p/p de L- α -fosfatidilcolina y un 0,01-5% p/p de Poloxámero 188.

5 En una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable donde la composición farmacéutica es una emulsión de aceite en agua que comprende un 2,5% p/p de escualeno como un componente oleoso, un 0,23% p/p de L- α -fosfatidilcolina y un 0,05% p/p de Poloxámero.

10 En cualquier realización, la composición farmacéutica comprende además un antígeno. En una realización, el antígeno es un péptido o una proteína. En una realización, el antígeno es un antígeno procedente de un patógeno o es un antígeno tumoral. En una realización, el antígeno es cualquiera de los antígenos mencionados en la presente memoria descriptiva.

15 En una realización, se proporciona una emulsión de aceite en agua que comprende un compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable, un componente acuoso que es 1X PBS, un componente oleoso que es escualeno, Span (marca registrada) 85 (Trioleato de sorbitán) y Poloxámero 188.

20 En una realización, se proporciona una emulsión de aceite en agua que comprende un 0,01-5% p/p de un compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable, un componente acuoso que es 1X PBS, un componente oleoso que es un 2,5% p/p de escualeno, un 0,23% p/p de Span (marca registrada) 85 (trioleato de sorbitán) y un 0,3% p/p de Poloxámero 188.

25 En una realización, se proporciona una emulsión de aceite en agua que comprende un compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable, un componente acuoso que es 1X PBS, un componente oleoso que es escualeno, L- α -fosfatidilcolina y Poloxámero 188.

30 En una realización, se proporciona una emulsión de aceite en agua que comprende un 0,01-5% p/p de un compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable, un componente acuoso que es 1X PBS, un componente oleoso que es un 2,5% p/p de escualeno, un 0,23% p/p de L- α -fosfatidilcolina y un 0,05% p/p de Poloxámero 188.

35 En una realización, se proporciona una emulsión de aceite en agua que comprende un 0,01-5% p/p de un compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable, un componente acuoso que es 1X PBS, un componente oleoso que es un 2,5% p/p de escualeno, 0,23% p/p de Span (marca registrada) 85 (trioleato de sorbitán) y un 0,3% p/p de Poloxámero 188, donde el tamaño medio de partícula de las microgotas de la emulsión es de 120 nm $\pm$ 10 nm.

40 En una realización, se proporciona una emulsión de aceite en agua que comprende un 0,01-5% p/p de un compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable, un componente acuoso que es 1X PBS, un componente oleoso que es un 2,5% p/p de escualeno, 0,23% p/p de L- α -fosfatidilcolina y un 0,05% p/p de Poloxámero 188, donde el tamaño medio de partícula de las microgotas de la emulsión es de 120 nm $\pm$ 10 nm.

45 En cualquier realización, la emulsión de aceite en agua comprende un componente acuoso que es PBS (solución salina tamponada con fosfato). En cualquier realización, el PBS es 1X PBS.

50 En cualquier realización, la emulsión de aceite en agua comprende microgotas con un tamaño medio de partícula de las microgotas de la emulsión de 10-1000 nm $\pm$ 10 nm. En cualquier realización, la emulsión de aceite en agua comprende microgotas con un tamaño medio de partícula de las microgotas de la emulsión de 20-500 nm $\pm$ 10 nm. En cualquier realización, la emulsión de aceite en agua comprende microgotas con un tamaño medio de partícula de las microgotas de la emulsión de 50-250 nm $\pm$ 10 nm. En cualquier realización, la emulsión de aceite en agua comprende microgotas con un tamaño medio de partícula de las microgotas de la emulsión de 100-140 nm $\pm$ 10 nm. En cualquier realización, la emulsión de aceite en agua comprende microgotas con un tamaño medio de partícula de las microgotas de la emulsión de 120 nm $\pm$ 10 nm.

55 En cualquier realización, la emulsión de aceite en agua comprende además un antígeno. En una realización, el antígeno es un péptido o una proteína. En una realización, el antígeno es un antígeno procedente de un patógeno o es un antígeno tumoral. En una realización, el antígeno es cualquiera de los antígenos mencionados en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, en el párrafo [0139] o párrafo [0147].

60 El compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable o composiciones farmacéuticas de cualquiera se pueden administrar en combinación simultánea con un antígeno o en combinación secuencial con un antígeno. La dosis del compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable es por lo general de 5 - 5000 mg/m² (área de superficie corporal) para un animal de sangre caliente, o el compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable se puede administrar en una dosis unitaria de aproximadamente 0,1 - 100 mg/kg, que puede ser una cantidad terapéuticamente efectiva de este. La forma farmacéutica unitaria tal como comprimidos, dispositivos inyectables y cápsulas contienen por lo general, por ejemplo, 1 - 250 mg de compuesto de fórmula (1). En una
65 realización, el compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable se puede administrar en un intervalo de 1 - 50 mg/kg por día. Sin embargo, la dosis diaria se puede modificar dependiendo del paciente que se va a tratar,

una ruta de administración específica y la gravedad de una enfermedad que se va a tratar. Por lo tanto, un facultativo que trata a cada paciente puede decidir cada dosis optimizada.

Como ya se mencionó, los compuestos representados por la fórmula (1) o sus sales farmacéuticamente aceptables, o composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos o sales se pueden utilizar como adyuvantes de vacuna para retener o mejorar la antigenicidad de un antígeno.

Tales antígenos incluyen proteína antigénica tumoral o péptidos antigénicos tumorales derivados de una proteína antigénica tumoral (por ejemplo, NY-ESO-1, MAGE-3, WT1 o Her2/neu), una región hipervariable de un antígeno o una proteína antigénica o su péptido parcial derivado de un virus o bacteria. Por lo tanto, un compuesto de la presente memoria descriptiva o su sal farmacéuticamente aceptable combinado con dicho antígeno se puede utilizar como un medicamento para el tratamiento o la profilaxis del cáncer o la infección de virus o bacterias.

Además, el compuesto de la presente memoria descriptiva o su sal farmacéuticamente aceptable se puede utilizar como un adyuvante para ayudar a la actividad inmunoestimulante en otro método de tratamiento inmunológico. El método específico de tratamiento incluye, por ejemplo, un enfoque *ex vivo* e *in vivo* para potenciar la inmunogenicidad en las células tumorales de los pacientes (por ejemplo, la transfección de una citocina tal como interleucina 2, interleucina 4 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), una estrategia para reducir la anergia de los linfocitos T, una estrategia con células inmunitarias transfectadas (por ejemplo, células dendríticas transfectadas con citocinas), una estrategia con una línea celular tumoral transfectada con citocinas y una estrategia para reducir la función de las células supresoras inmunitarias (por ejemplo, linfocitos T reguladores, células supresoras derivadas de la médula ósea o expresión de IDO (indoleamina 2,3-dioxigenasa) en células dendríticas).

El término «tratar», «que trata» o «tratamiento» utilizado en la presente significa aliviar total o parcialmente uno o más, o todos los síntomas de una enfermedad; o inhibir o retrasar la evolución de una enfermedad.

El término «prevenir», «que previene» o «prevención» utilizado en la presente incluye la prevención primaria (es decir, prevenir la aparición de una enfermedad) y la prevención secundaria (es decir, prevenir la recaída de un paciente cuyos síntomas se aliviaron o cuya enfermedad se curó).

El compuesto de la presente memoria descriptiva o su sal farmacéuticamente aceptable, que tiene una actividad inmunológica adyuvante *in vitro* o *in vivo*, es útil como un adyuvante de vacuna. La actividad adyuvante inmunológica incluye la inducción de la producción de anticuerpos, la activación de linfocitos y similares.

El compuesto de la presente memoria descriptiva o su sal farmacéuticamente aceptable se utiliza para retener o potenciar la actividad inmunoestimulante de un antígeno que es un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad. El antígeno incluye, sin carácter limitante, una proteína antigénica o un péptido (péptido parcial) antigénico derivado de la proteína antigénica.

Más específicamente, el compuesto de la presente memoria descriptiva o su sal farmacéuticamente aceptable es útil para tratar o prevenir un cáncer mediante la administración en combinación con una proteína antigénica tumoral o un péptido antigénico tumoral para inmunoterapia contra el cáncer. El cáncer incluye, por ejemplo, cánceres generales tales como cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de páncreas, cáncer intestinal, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer anogenital, genital cáncer, cáncer gástrico, cáncer de la piel (por ejemplo, melanoma metastásico), cáncer de hígado y tumor cerebral; y enfermedades malignas que afectan a la médula ósea (incluida la leucemia) y el sistema linfotrófico, tales como el linfoma de Hodgkin o el linfoma no hodgkiniano o el linfoma de Burkitt. El tratamiento o prevención del cáncer en estos casos incluye la prevención de la enfermedad metastásica y la recurrencia del tumor, y la prevención y el tratamiento del síndrome paraneoplásico.

Por lo tanto, en cualquier realización donde se mencionan cáncer o tumores en un sentido general, el cáncer o tumor puede ser cualquiera de las afecciones enumeradas en el párrafo anterior.

Los antígenos específicos que se pueden utilizar en una terapia de este tipo incluyen, por ejemplo, MAGE (*Science*, 254: pág.1643 (1991)), gp100 (*J. Exp. Med.*, 179: pág. 1005 (1994)), MART-1 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: pág. 3515 (1994)), tirosinasa (*J. Exp. Med.*, 178: pág. 489 (1993)), proteínas relacionadas con MAGE (*J. Exp. Med.*, 179: pág. 921 (1994)), β -catenina (*J. Exp. Med.*, 183: pág. 1185 (1996)), CDK4 (*Science*, 269: pág. 1281 (1995)), HER2/neu (*J. Exp. Med.*, 181: pág. 2109 (1995)), p53 de tipo mutante (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: pág. 14704 (1996)), CEA (*J. Natl. Cancer. Inst.*, 87: pág. 982 (1995)), PSA (*J. Natl. Cancer. Inst.*, 89: pág. 293 (1997)), WT1 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: pág. 13885 (2004)), un antígeno derivado del HPV (*J. Immunol.*, 154: pág. 5934 (1995)), MUC-1, HPV-E6, HPV-E7, HBsAg, HBcAg, Trp1, Trp2, EBV-gp350 y un antígeno derivado de EBV (*Int. Immunol.*, 7: pág. 653 (1995)).

El péptido antigénico tumoral derivado de un antígeno canceroso incluye, por ejemplo, el péptido MAGEA3 168-176 (Coulie PG *et al.*, *Immunol. Rev.* 188: 33 (2002)), péptido gp100 209-217 (Rosenberg SA *et al.*, *Nat. Med.* 4: 321 (1998)), péptido gp100 280-288 (Phan GQ *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 8372 (2003)), péptido Melan-A 27-

35 (Cormier JN *et al.*, *Cancer J. Sci. Am.* 3: 37 (1997)), péptido Melan-A 26-35, péptido tirosinasa 1-9, péptido tirosinasa 368-376, péptido gp100 280-288, péptido gp100 457-466 (Jager E *et al.*, *Int. J. Cancer* 67: 54 (1996)), péptido HER-2 369-384, péptido HER-2 688-703, péptido HER-2 971-984 (Knutson KL *et al.*, *J. Clin. Invest.* 107: 477 (2001)), y el péptido MAGE-A12 170-178 (Bettinotti MP *et al.*, *Int. J. Cancer* 105: 210 (2003)).

Además, el compuesto de la presente memoria descriptiva o su sal farmacéuticamente aceptable se puede administrar combinado con un principio activo de una vacuna terapéutica o profiláctica para la infección para prevenir diversas infecciones, por ejemplo, una enfermedad viral tal como verruga genital, verruga vulgar, verruga plantar, hepatitis B, hepatitis C, virus del herpes simple, molusco contagioso, viruela, virus de inmunodeficiencia humana (HIV, por sus siglas en inglés), virus del papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés), citomegalovirus (CMV), virus varicela-zoster (VZV, por sus siglas en inglés), rinovirus, enfermedad mediada por el virus de Epstein-Barr (EBV, por sus siglas en inglés), adenovirus, coronavirus, gripe y paragripe; una enfermedad bacteriana tal como tuberculosis, micobacteria avar, infección por *staphylococcus aureus* y lepra; una infección fúngica, infección por *Chlamydia*, *Candida*, *Aspergillus*, meningitis criptocócica, *Pneumocystis carinii*, criptosporidiosis, histoplasmosis, toxoplasmosis, tripanosomiasis, malaria y leishmaniasis. El principio activo de una vacuna preventiva contra la infección incluye sustancias derivadas de microorganismos/patógenos tales como bacterias, hongos, protozoos y virus que causan infecciones, por ejemplo, una proteína antigénica, un péptido antigénico (péptido parcial) derivado de la proteína, polisacárido, lípidos y complejos de estos.

El péptido antigénico derivado de un virus incluye, por ejemplo, el péptido proteico de la matriz de la gripe 58-66 (Jager E *et al.*, *Int. J. Cancer* 67: 54 (1996)), péptido HPV16 E7 86-93 (van Driel WJ *et al.*, *Eur. J. Cancer* 35: 946 (1999)), péptido HPV E7 12-20 (Scheibenbogen C *et al.*, *J. Immunother.* 23: 275 (2000)), péptido HPV16 E7 11-20 (Smith JWI *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 21: 1562 (2003)), HSV2 gD (Berman PW *et al.*, *Science* 227: 1490 (1985)), CMV gB (Frey SE *et al.*, *Infect Dis.* 180: 1700 (1999), Gonczol E. *et al.*, *Exp. Opin. Biol. Ther.* 1: 401 (2001)), CMV pp65 (Rosa CL *et al.*, *Blood* 100: 3681 (2002), Gonczol E. *et al.*, *Exp. Opin. Biol. Ther.* 1: 401 (2001)) y similares.

El péptido antigénico se puede preparar mediante síntesis o clonación de ADNc para codificar un péptido antigénico y posteriormente expresarlo en una célula hospedadora, según un manual estándar tal como Molecular Cloning 2.^a Ed., y Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

El péptido antigénico se puede sintetizar de acuerdo con un método convencional utilizado en la química general de péptidos. El método sintético se describe, por ejemplo, en una referencia como Peptide Synthesis, Interscience, Nueva York, 1966; y The Proteins, vol. 2, Academic Press Inc., Nueva York, 1976.

Por lo tanto, en una realización se proporciona un compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable para su uso en terapia.

En una realización, se proporciona un compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer.

En una realización, se proporciona un compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento del cáncer.

En una realización, se proporciona un compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención del cáncer.

En una realización, se proporciona un compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer donde el cáncer se selecciona entre melanoma metastásico, cáncer de cuello de útero, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer de pulmón y cáncer de hígado.

En una realización adicional, se proporciona un kit que comprende:

- (a) un compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable;
- (b) un antígeno;
- (c) un recipiente o dispositivo que puede contener cada unidad de administración de (a) y (b) combinadas o separadas; y opcionalmente
- (d) Instrucciones de uso.

El antígeno incluye, pero sin limitarse a estos siempre que sea un antígeno utilizado con un principio activo de la vacuna, la proteína mencionada anteriormente o un péptido (péptido parcial) antigénico derivado de la proteína.

En una realización, se proporciona un uso de un compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable para la fabricación de un adyuvante de vacuna.

Se proporciona un uso de un compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable como un adyuvante de vacuna para la fabricación de una vacuna para tratar o prevenir una enfermedad o afección.

Se proporciona un método de tratamiento o prevención que comprende un paso de administrar una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable con una sustancia inmunoestimulante a un paciente que lo necesite.

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente memoria descriptiva se ilustra adicionalmente mediante Ejemplos, pero no se debe considerar que se limita a estos.

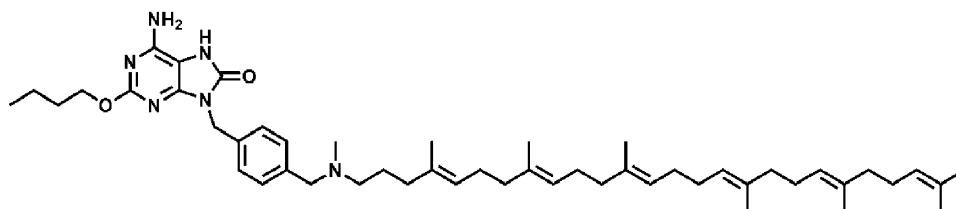
Abreviaturas:

THF: tetrahidrofurano
EtOAc: acetato de etilo
NMP: *N*-metilpirrolidinona
TEA: trietilamina

Ejemplo 1

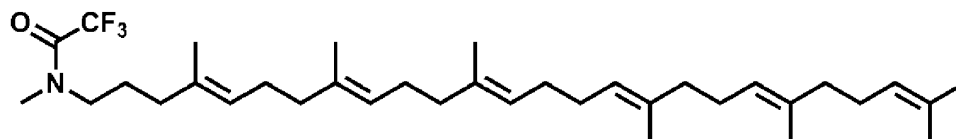
6-amino-2-butoxi-9-[4-({[(4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexaen-1-il](metil)amino}metil)bencil]-7,9-dihidro-8*H*-purin-8-ona:

[Quim. 35]



Paso 1

[Quim. 36]

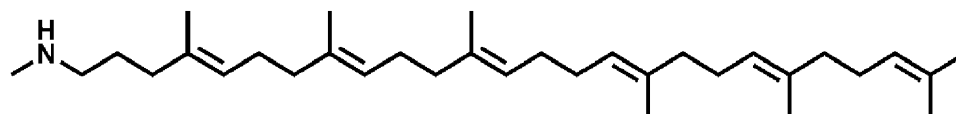


A una solución de (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*, 20*E*)-4,9,13,16,20,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexen-1-amina (492 mg) en THF a 0 °C se añadió anhídrido trifluoroacético (0,27 mL) y a continuación la mezcla se calentó hasta la temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. La solución de reacción se concentró al vacío y se añadió EtOAc al residuo. La solución de EtOAc se lavó con cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera, y a continuación se secó con sulfato de sodio. El sulfato de sodio se eliminó de la solución, y a continuación la solución se concentró para obtener un producto oleoso. Al producto oleoso se añadieron carbonato de cesio (710 mg), THF (20 mL) y yoduro de metilo adicional (0,45 mL), y la mezcla se agitó durante la noche. Se añadió EtOAc a la mezcla de reacción, y la mezcla se lavó con cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera, y a continuación se secó con sulfato de sodio. El sulfato de sodio se eliminó de la solución, y a continuación la solución se concentró para obtener un producto oleoso blanco. El producto oleoso blanco se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hexano/EtOAc = 7/1) para obtener el compuesto deseado (421 mg).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,08-5,18 (m, 6 H), 3,30-3,40 (m, 2 H), 2,99-3,09 (m, 3 H), 1,98-2,10 (m, 22 H), 1,52-1,71 (m, 23 H).

Paso 2

[Quim. 37]

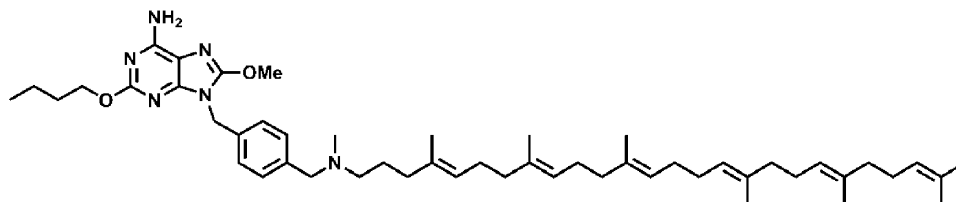


Al compuesto preparado en el Paso 1 (175 mg) se añadieron metanol (2 mL), agua (0,5 mL) y carbonato de potasio (257 mg), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas. Se añadió agua a la mezcla de reacción, y la mezcla se extrajo con cloroformo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó con sulfato de sodio y a continuación se concentró al vacío para obtener el compuesto deseado (146 mg).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,07-5,12 (m, 6 H), 2,52-2,56 (m, 2 H), 2,42 (s, 3 H), 1,90-2,13 (m, 22 H), 1,52-1,72 (m, 23 H).

Paso 3

[Quím. 38]



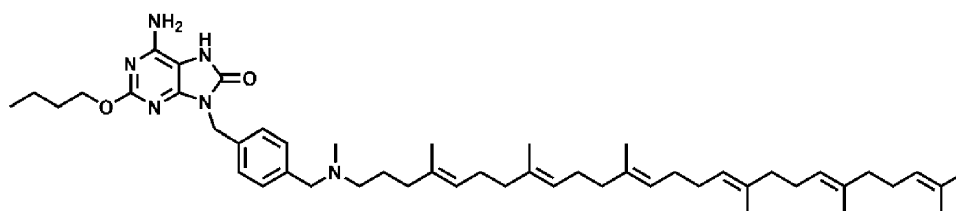
De acuerdo con el método descrito en el documento WO2007/034817, se preparó 4-(((6-amino-2-butoxi-8-metoxi-9H-purin-9-il)metil)fenil)metanol, se disolvieron 72 mg del compuesto en NMP (2,0 mL), y la solución se enfrió hasta 0 °C. A esto se añadió TEA (0,06 mL), y a continuación se añadió gota a gota una cantidad excesiva de cloruro de metanosulfonilo (0,05 mL). La mezcla se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. Se añadió EtOAc a la mezcla de reacción, y a continuación, la mezcla se lavó con cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio. El sulfato de sodio se eliminó de la solución, y a continuación la solución se concentró para obtener un producto amorfo blanco. El producto se purificó de manera aproximada por cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl₃/MeOH = 10/1). El producto oleoso resultante se disolvió en NMP (1,5 mL) y se enfrió hasta 0 °C. A la solución se añadió el producto oleoso preparado en el Paso 2 (102 mg), y a continuación la mezcla se calentó hasta la temperatura ambiente y se agitó durante la toda la noche. Se añadió EtOAc a la mezcla de reacción, y a continuación, la mezcla se lavó con cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio. El sulfato de sodio se eliminó de la solución, y a continuación la solución se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl₃/MeOH = 10/1) para obtener el compuesto deseado, es decir, 2-butoxi-9-[4-(((4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexaenil)metilamino)metil]fenil]-8-metoxipurin-6-amina (101 mg).

Condiciones de análisis de masas (LC/MS)

MS: espectrómetro de masas Sciex API 150EX de Perkin-Elmer detector (40 eV)
HPLC: LC 10ATVP de Shimadzu
Columna: CAPCELL PAK C18 ACR (S-5 µm, 4,6 mm x 50 mm) de Shiseido
Disolvente A: 0,035% de TFA/CH₃CN
Disolvente B: 0,05% de TFA/H₂O
Tasa de flujo: 3,5 mL/min
Detector: UV 254, 220 nm
Gradiente: 0,0-0,5 min 80% de disolvente A, 0,5-4,8 min gradiente lineal del disolvente A de un 80 a un 99%, 4,8-5,0 min 99% de disolvente A
Análisis de masas (LC / MS): 1,46 min; [M + H]⁺ = 807,9 (Calc.: 807,6)

Paso 4

[Quím. 39]



El compuesto preparado en el Paso 3, 2-butoxi-9-[4-(((4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexaen-1-il)(metil)amino)metil]bencil]-8-metoxi-9H-purin-6-amina, (105 mg) se disolvió en cloroformo (1,0 mL) y se añadió a esto un 5-10% de ácido clorhídrico/metanol (6,0 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora y a continuación se concentró. Se añadió cloroformo al residuo, y la solución de cloroformo se lavó con agua en condiciones básicas. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio. El sulfato de sodio se eliminó con un filtro, y a continuación la solución orgánica se concentró al vacío. El residuo se purificó de manera poco exhaustiva por cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl₃/MeOH = 10/1), y después por cromatografía en columna de gel de sílice-amino (CHCl₃/MeOH = 10/1) para obtener el compuesto deseado (67 mg).

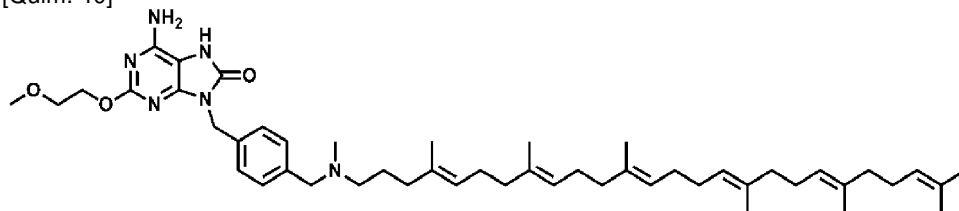
HRMS (ESI) masa exacta calc. para C₅₀H₇₆N₆O₂: m/z 793,6103 ([M + H]⁺), observada: m/z 793,6102 ([M + H]⁺).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 10,6 (a, 1H), 7,26-7,32 (m, 4 H), 5,52 (s, 2 H), 5,08-5,18 (m, 6 H), 5,02 (s, 2 H), 4,26 (t, J = 6,6 Hz, 2 H), 3,55 (a, 2 H), 2,42 (m, 2 H), 2,21 (s, 3 H), 1,91-2,10 (m, 20 H), 1,42-1,80 (m, 29 H), 0,95 (t, J = 7,3 Hz, 3,0 H)

Ejemplo 2

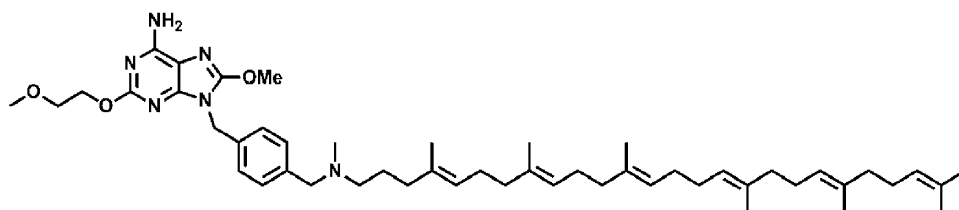
Preparación de 6-amino-9-[4-(((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexaen-1-il)(metil)amino}metil)bencil]-2-(2-metoxietoxi)-7,9-dihidro-8*H*-purin-8-ona:

5 [Quim. 40]



Paso 1

[Quim. 41]



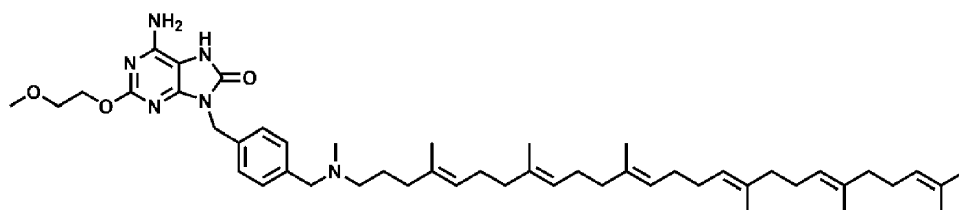
10 Se preparó 9-[4-(((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexaen-1-il)(metil)amino}metil)bencil]-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)-9*H*-purin-6-amina de manera similar al Paso 3 en el Ejemplo 1 utilizando 4-(((6-amino-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)-9*H*-purin-9-il)metil)fenil)metanol (70 mg) como material de partida (rendimiento: 71 mg).

Condiciones de análisis de masas (UPLC/MS)

UPLC/MS: ACQUITY UltraPerformance LC-PDA-ELSD-SQD (Waters)
HPLC: ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μ m, 2,1 x 30 mm (N.º Part. 186002349)
20 Columna: CAPCELL PAK C18 ACR (S-5 μ m, 4,6 mm x 50 mm) de Shiseido
Disolvente A: CH₃CN
Disolvente B: 0,05% de ácido fórmico/H₂O
Tasa de flujo: 0,8 mL/min
Detector: UV 254, 220 nm
25 Gradiente: 0,0-1,3 min gradiente lineal del disolvente A de un 60 a un 95%
Análisis de masas UFLC/MS 0,885 min; [M + H]⁺ = 809,8 (calc.: 809,6)

Paso 2

[Quim. 42]

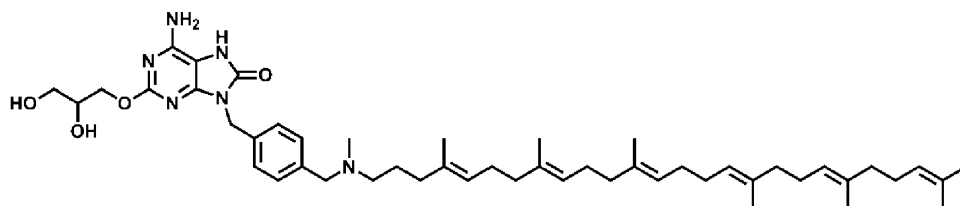


30 El compuesto deseado anterior se preparó de manera similar al Paso 4 en el Ejemplo 1 utilizando el compuesto (71 mg) del Paso 1, es decir
9-[4-(((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexaen-1-il)(metil)amino}metil)bencil]-8-metoxi-2-(2-metoxietoxi)-9*H*-purin-6-amina (rendimiento: 49 mg).
35 HRMS (ESI) masa exacta calc. para C₄₉H₇₄N₆O₃: m/z 795,5895 ([M + H]⁺), observada: m/z 795,5895 ([M + H]⁺)
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 10,8 (a, 1 H), 7,24-7,31 (m, 4 H), 5,75 (s, 2 H), 5,08-5,18 (m, 6 H), 5,02 (s, 2 H), 4,44-4,47 (m, 2 H), 3,72-3,74 (m, 2 H), 3,44 (s, 2 H), 3,41 (s, 3 H), 2,31-2,36 (m, 2 H), 2,14 (s, 3 H), 1,90-2,10 (m, 22 H), 1,49-1,80 (m, 23 H).

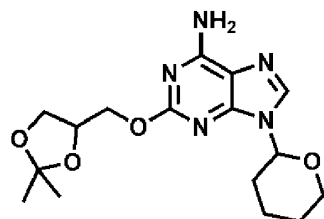
Ejemplo 3

Preparación de 6-amino-2-(2,3-dihidroxipropoxi)-9-[4-(((4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexaenil)metilamino]metil]fenil]metil]-7*H*-purin-8-ona:

45 [Quim. 43]

**Paso 1**

[Quim. 44]



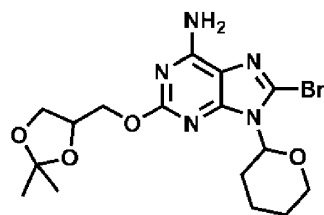
A una mezcla de 2-cloro-9-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-9*H*-purin-6-amina (1,00 g) preparada de la manera descrita en el documento WO 2012/011606 y (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metanol (5,0 mL) se añadió hidruro de sodio (473 mg), y la mezcla se agitó a 60 °C durante 8 horas. Se añadió EtOAc a la mezcla de reacción, y a continuación, la mezcla se lavó con cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio. El sulfato de sodio se eliminó de la solución, y a continuación la solución se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl₃/MeOH = 20/1) para obtener el compuesto deseado (1,43 g).

Condiciones de análisis de masas (UPLC/MS)

UPLC/MS: ACQUITY UltraPerformance LC-PDA-ELSD-SQD (Waters)
 HPLC: ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 µm, 2,1 x 30 mm (N.º Part. 186002349)
 Columna: CAPCELL PAK C18 ACR (S-5 µm, 4,6 mm x 50 mm) de Shiseido
 Disolvente A: CH₃CN
 Disolvente B: 0,05% de ácido fórmico/H₂O
 Tasa de flujo: 0,8 mL/min
 Detector: UV 254, 220 nm
 Gradiente: 0,0-1,3 min gradiente lineal del disolvente A de un 10 a un 95%
 Análisis de masas UPLC/MS 0,591 min; [M + H]⁺ = 350,2 (calc.: 350,2)

Paso 2

[Quim. 45]



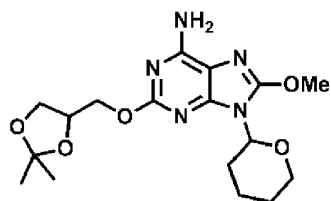
El compuesto preparado en el Paso 1 (607 mg) se disolvió en DMF (5,0 mL), y se añadió *N*-bromosuccinimida (325 mg) a este en tres porciones. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió EtOAc a la mezcla de reacción, y a continuación, la mezcla se lavó con cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio. El sulfato de sodio se eliminó de la solución, y a continuación la solución se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl₃/MeOH = 10/1) para obtener el compuesto deseado (419 mg).

Gradiente: 0,0-1,3 min gradiente lineal del disolvente A de un 10 a un 95%

Análisis de masas UPLC/MS 0,749 min; [M + H]⁺ = 428,3 (calc.: 428,1)

Paso 3

[Quím. 46]



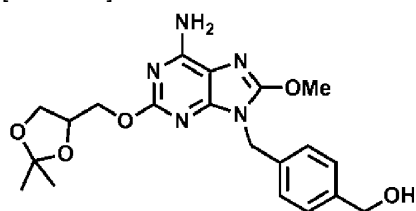
El compuesto preparado en el Paso 2 (419 mg) se disolvió en metanol (50 mL), y se añadió NaOH acuoso 2 N (15 mL) a este. La mezcla se agitó durante 8 horas a reflujo. La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y a continuación se eliminó al vacío el disolvente. Se añadió EtOAc a la mezcla de reacción, y a continuación, la mezcla se lavó con cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio. El sulfato de sodio se eliminó de la solución, y a continuación la solución se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10/1$) para obtener el compuesto deseado (333 mg).

Gradiente: 0,0-1,3 min gradiente lineal del disolvente A de un 10 a un 95%

Análisis de masas UFLC/MS 0,669 min; $[M + H]^+ = 380,3$ (calc.: 380,2)

Paso 4

[Quim. 47]



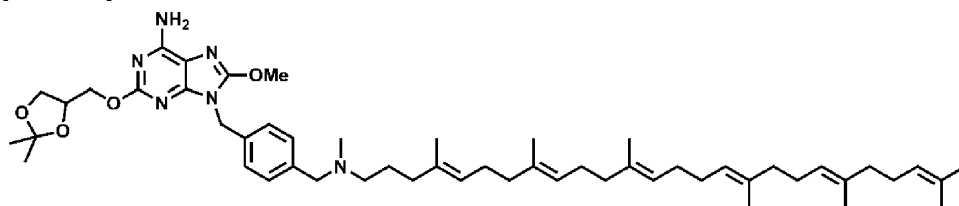
El compuesto preparado en el Paso 3 (333 mg) se disolvió en metanol (5,0 mL), y se añadió ácido trifluoroacético (3,0 mL) a este. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y a continuación, se concentró. El residuo, 0,23 mL de 2,2-dimetoxipropeno y una cantidad catalítica de ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado se disolvieron en DMF, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, a la mezcla de reacción se añadieron carbonato de potasio (255 mg) y (4-(clorometil)fenil)metanol (165 mg), y la mezcla se agitó durante toda la noche. Se añadió EtOAc a la mezcla de reacción, y a continuación, la mezcla se lavó con cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio. El sulfato de sodio se eliminó de la solución, y a continuación la solución se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10/1$) para obtener el compuesto deseado (80 mg).

Gradiente: 0,0-1,3 min gradiente lineal del disolvente A de un 10 a un 95%

Análisis de masas UFLC/MS 0,585 min; $[M + H]^+ = 416,3$ (calc.: 416,2)

Paso 5

[Quim. 48]



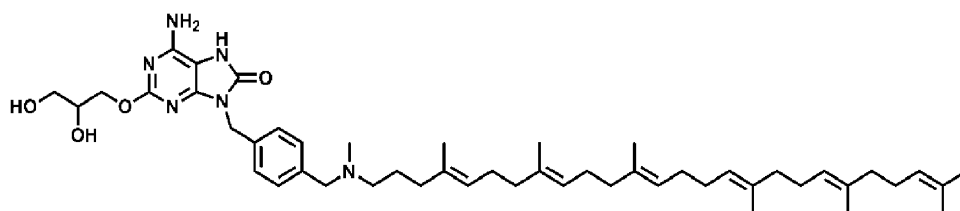
El compuesto deseado anterior 2-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metoxi]-9-[4-({[(4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17, 21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexaen-1-il](metil)amino)metil]bencil]-8-metoxi-9*H*-purin-6-amina se preparó de manera similar al Paso 3 en el Ejemplo 1 utilizando el compuesto (81 mg) del Paso 4 (rendimiento: 113 mg).

Gradiente: 0,0-1,3 min gradiente lineal del disolvente A de un 60 a un 95%

Análisis de masas UFLC/MS 0,950 min; $[M + H]^+ = 865,8$ (calc.: 865,6)

Paso 6

[Chem. 49]



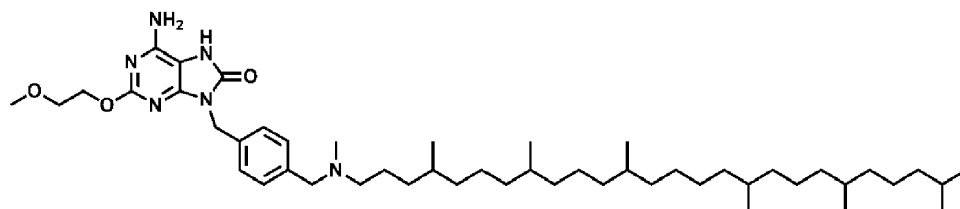
El compuesto deseado anterior se preparó de manera similar al Paso 4 en el Ejemplo 1 utilizando el compuesto (113 mg) preparado en el Paso 5 (rendimiento: 51 mg).

- 5 HRMS (ESI) masa exacta calc. para $C_{49}H_{74}N_6O_4$: m/z 811,5844 ($[M + H]^+$), observada: m/z 811,5845 ($[M + H]^+$)
 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$ - CD_3OD) δ 7,29-7,45 (m, 4 H), 5,06-5,20 (m, 6 H), 5,00 (s, 2 H), 4,30-4,40 (m, 2 H), 3,95-4,05 (m, 1 H), 3,61-3,74 (m, 4 H), 2,20-2,60 (m, 5 H), 1,90-2,15 (m, 22 H), 1,50-1,80 (m, 23 H).

Ejemplo 4

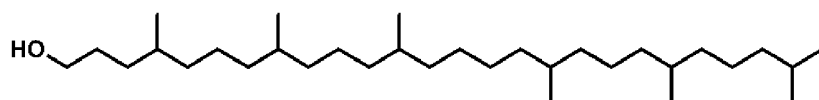
- 10 **Preparación de 6-amino-9-(4-[[4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosil)(metil)amino]metil]bencil)-2-(2-metoxietoxi)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona:**

[Quim. 50]



- 15 **Paso 1**

[Quim. 51]

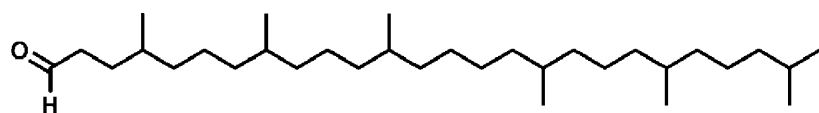


- 20 A una solución de (4*E*,8*E*,12*E*,16*E*,20*E*)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexaen-1-ol (100 mg) en EtOH (2 mL) se añadió Pd-C al 10% (50% en agua) (50 mg) y ácido acético (1 mL), y a continuación la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 7 h en atmósfera de hidrógeno (0,45 MPa). La mezcla de reacción se filtró a través de Celite y el filtrado se concentró al vacío. El residuo oleoso se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hexano/EtOAc = 10/1) para obtener el compuesto deseado (78 mg).

- 25 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3,63 (t, J = 6,8 Hz, 2 H), 1,65-0,98 (m, 42 H), 0,89-0,81 (m, 21 H).

Paso 2

[Quim. 52]

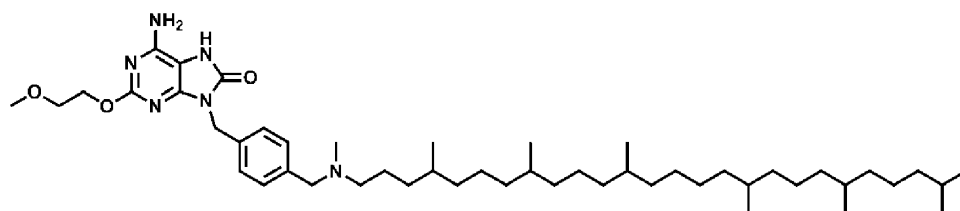


- 30 Al compuesto preparado en el Paso 1 (200 mg) se añadió cloroformo (4 mL) y peryodinano de Dess-Martin (273 mg) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió una solución acuosa saturada de tiosulfato de sodio a la mezcla de reacción y la mezcla se extrajo con éter dietílico. La capa orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y salmuera, se secó con sulfato de sodio y a continuación se concentró al vacío. El residuo oleoso se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Hexano/EtOAc = 10/1) para obtener el compuesto deseado (57 mg).

- 35 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,71 (t, J = 2,0 Hz, 1 H), 2,39-2,30 (m, 2 H), 1,66-0,90 (m, 40 H), 0,83-0,73 (m, 21 H).

Paso 3

- 40 [Quim. 53]



Seguendo el método descrito en el documento WO2007/034817, se preparó 6-amino-2-(2-metoxietoxi)-9-(4-((metilamino)metil)bencil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona y se disolvieron 42 mg del compuesto y el aldehído preparado en el paso 2 (47 mg) en cloroformo (1 mL). A esto se añadieron ácido acético (13 µL) y triacetoxiborohidruro de sodio (35 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se añadió agua a la mezcla de reacción, y la mezcla se extrajo con cloroformo. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó con sulfato de sodio y a continuación se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Cloroformo/Metanol = 10/1) para obtener el compuesto deseado (25 mg).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,39-7,28 (m, 4 H), 5,56 (s, 2 H), 5,00 (s, 2 H), 4,45-4,41 (m, 2 H), 3,75-3,71 (m, 2 H), 3,41 (s, 2 H), 3,40 (s, 3 H), 2,68-2,55 (m, 2 H), 2,41 (s, 3 H), 1,70-0,95 (m, 42 H), 0,90-0,75 (m, 21 H).

Condiciones de análisis de masas (LC/TOFMS)

MS: detector LCMS-IT-TOF

HPLC: Nexera X2 LC 30AD de Shimadzu

Columna: Kinetex 1,7 µm C18 100A Nueva columna 50 × 2,1 mm

Disolvente A: 0,1% de TFA/H₂O

Disolvente B: CH₃CN

Tasa de flujo: 1,2 mL/min

Detector: UV 254, 220 nm

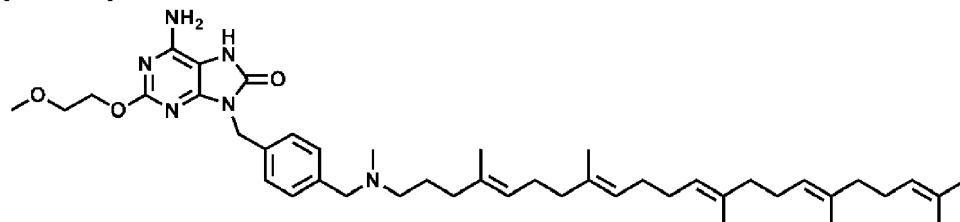
Gradiente: 0,01-1,40 min gradiente lineal del disolvente B de un 10 a un 95%, 1,40-1,60 min 95% del disolvente B, 1,61,8-2,00 min 99 % del disolvente B

ESI: [M+H]⁺ 807,6

Ejemplo 5

Preparación de 6-amino-2-(2-metoxietoxi)-9-[4-((metil[(4E,8E,12E,16E)-4,8,13,17,21-pentametildocosa-4,8,12,16,20-pentaen-1-il]amino)metil)bencil]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona:

[Quim. 54]



El compuesto deseado anterior se preparó de manera similar al Paso 3 en el Ejemplo 4 utilizando 6-amino-2-(2-metoxietoxi)-9-(4-((metilamino)metil)bencil)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona (36 mg) y 1,1',2-tris-norsqualenoaldehído (38 mg) preparado según el método descrito en *Org. Biomol. Chem.* 2, 1456, (2004) como material de partida (rendimiento: 19 mg).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,34-7,28 (m, 4 H), 5,67 (s, 2 H), 5,13-5,04 (m, 5 H), 5,00 (s, 2 H), 4,45-4,40 (m, 2 H), 3,74-3,70 (m, 2 H), 3,61 (s, 2 H), 3,40 (s, 3 H), 2,51-2,46 (m, 2 H), 2,26 (s, 3 H), 1,90-2,10 (m, 18 H), 1,49-1,80 (m, 20 H).

Condiciones de análisis de masas (LC/TOFMS)

MS: detector LCMS-IT-TOF

HPLC: Nexera X2 LC 30AD de Shimadzu

Columna: Kinetex 1,7 µm C18 100A Nueva columna 50 × 2,1 mm

Disolvente A: 0,1% de TFA/H₂O

Disolvente B: CH₃CN

Tasa de flujo: 1,2 mL/min

Detector: UV 254, 220 nm

Gradiente: 0,01-1,40 min gradiente lineal del disolvente B de un 10 a un 95%, 1,40-1,60 min 95% del disolvente B, 1,61,8-2,00 min 99 % del disolvente B

ESI: [M+H]⁺ 727,4

Se prepararon varias formulaciones de emulsiones de aceite en agua que comprenden los Ejemplos 1 a 3 como se describe en los Ejemplos 6 a 9. Cabe señalar que en las Figuras 1 a 12 que muestran la actividad de estas emulsiones, se hace referencia a los Ejemplos 6 a 9 por sus nombres alternativos:

- Ejemplo 6 = ACVT-03;
- Ejemplo 7 = ACVT-01;
- Ejemplo 8 = ACVT-02; y
- Ejemplo 9 = ME7.

Materiales y equipo:

- Sonificador de VWR, Symphony;
- Mezclador de Silverson, modelo L5M-A;
- Microfluidizador de Microfluidics (marca registrada), modelo M110P;
- 10X PBS de Lonza, P/N 17-517Q, n.º de lote 0000298339 (se preparó 1X PBS diluyendo 10X PBS con agua NanoPure y filtrándolo a través de un filtro de 0,22 µm);
- Span (marca registrada) 85 (trioleato de sorbitán) de Sigma, P/N S7135, n.º de lote MKBF5282V;
- Escualeno de Acros, P/N 207471000, n.º de lote A 0278995;
- Poloxámero 188 de Spectrum, P/N P1169, n.º de lote ZB0478;
- Agua NanoPure.

Métodos analíticos:

Se utilizó la dispersión dinámica de la luz para determinar el diámetro promedio de las micelas en las suspensiones. Las muestras se diluyeron 100X con agua justo antes de tomar una medida.

Se determinó que todas las emulsiones preparadas en la presente tienen un tamaño de partícula medio constante de 120 ± 10 nm.

- Instrumento DLS: Nano-ZS de Malvern;
- SOP utilizado: Tamaño, automatizado. Se tomaron tres medidas consecutivas y se promediaron los resultados;
- Tipo de cubeta: Cuarzo ZEN2112;
- Diluyente de la muestra: Agua para inyección de Thermo, P/N SH30221.10, n.º de lote AWE10443.

La cuantificación de la concentración del ligando del receptor de TLR7 se logró utilizando QTOF MassSpec utilizando una curva patrón generada por la masa seca solubilizada del ligando del receptor de TLR7. Por ejemplo, ACVT-2 se preparó al 4% p/p en tampón de formulación. La emulsión se diluyó 1:1 con tampón de formulación hasta una concentración de trabajo de un 2% p/p de emulsión estable. La emulsión se diluyó adicionalmente, en serie, a 0,04 y 0,02 mg/ml y se analizaron las 3 muestras. Utilizando QTOF-MS, se monitorizó el ligando del receptor de TLR7 según su masa intacta de 794,58 Daltons. El área EIC resultante representada frente a la concentración objetivo generó una línea de ajuste con un valor de R^2 de 0,9994, que indica linealidad de las muestras después de la dilución en serie. La linealidad de la línea de ajuste respalda la afirmación de que las partículas de la emulsión con superficie TL7L están distribuidas de manera uniforme.

La cuantificación de L- α -fosfatidilcolina y sus subproductos, el poloxámero 188 y el aceite de escualeno se realizó utilizando cromatografía líquida con un detector evaporativo de dispersión de luz en línea.

Ejemplo 6

«ACVT-03»

Paso 1 - Preparación de la fase oleosa

Se pesaron 22 mg del Ejemplo 3 en un recipiente con tapa de rosca y se añadieron 2,5 g de aceite de escualeno. El Ejemplo 3 se solubilizó a continuación por sonicación a 25 °C durante 60 minutos hasta que no se observaron partículas.

Paso 2 - Preparación de la fase acuosa

Se añadieron 1XPBS (95 g), Poloxámero 188 (0,3 g) y Span (marca registrada) 85 (trioleato de sorbitán) (0,25 g) a un segundo receptáculo. La solución se mezcló a temperatura ambiente durante 20 minutos hasta que estuvo exenta de partículas, y a continuación se filtró de forma estéril a través de un filtro de membrana de PES o PVDF de 0,2 µm.

Paso 3 - Preparación de una emulsión de fase continua

Las fases oleosa y acuosa preparadas de acuerdo con los pasos 1 y 2 se combinaron en un único recipiente y se mezclaron. La mezcla se llevó a cabo aumentando gradualmente hasta 9-10 000 RPM y procesando durante 5 minutos hasta que la mezcla fue una fase continua de aspecto blanco lechoso.

5 **Paso 4 - Microfluidización**

La emulsión de fase continua preparada en el Paso 3 se microfluidizó a través de una cámara de interacción de tipo Y a 25 000-30 000 PSI. Después de 8 pases, se determinó que el proceso había finalizado. El líquido resultante de color blanco lechoso se dividió en alícuotas en viales de vidrio despirogenado y se almacenó a 4 ° C cuando no se estaba utilizando.

10 **Ejemplo 7**

«ACVT-01»

El Ejemplo 7 se preparó de manera similar a la descrita en el Ejemplo 6, pero se utilizó el Ejemplo 1 como un componente en el Paso 1 en lugar del Ejemplo 3.

15 **Ejemplo 8**

«ACVT-02»

El Ejemplo 8 se preparó de manera similar a la descrita en el Ejemplo 6, pero se utilizó el Ejemplo 2 como un componente en el paso 1 en lugar del Ejemplo 3.

20 **Ejemplo 9**

«ME7»

El Ejemplo 9 se preparó de manera similar a la descrita en el Ejemplo 6, utilizando los siguientes materiales:

- Surfactantes: L- α -fosfatidilcolina (0,8% p/p) (surfactante iónico); Poloxámero 188 (0,05% p/p) (copolímero lineal no iónico)
- Aceite: Escualeno (40 mg/mL)
- Ligando del receptor de TLR7: Ejemplo 2 (1 μ g/mL-400 μ g/mL) Se añadió L- α -fosfatidilcolina a la fase oleosa antes de la sonicación. La emulsión resultante tuvo las siguientes características:
- Tamaño de partícula: 80-200 nm
- Estéril filtrable: Sí

35 **(Ejemplo de referencia 10) «ACVT»**

Para actuar como un control para los experimentos biológicos descritos en la presente, se preparó el Ejemplo de referencia 10 de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6 pero sin añadir nada del Ejemplo 3 en el paso 1. Por lo tanto, el Ejemplo de referencia 10 («ACVT») es una emulsión que no contiene el ligando del receptor de TLR7.

40 **(Ejemplo de referencia 11) «ME0»**

Para actuar como un control para los experimentos biológicos descritos en la presente, se preparó el Ejemplo de referencia 11 de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 9 pero sin añadir nada del Ejemplo 2 en el paso 1. Por lo tanto, el Ejemplo de referencia 11 («ME0») es una emulsión que no contiene el ligando del receptor de TLR7.

Aplicabilidad industrial

Se espera que los compuestos de la presente memoria descriptiva sean útiles como adyuvantes para potenciar la actividad inmunoestimulante, y se pueden utilizar como un aditivo en un preparado de vacuna (por ejemplo, un preparado de vacuna contra el cáncer) que comprende un antígeno (tal como un péptido antigénico tumoral) como un principio activo. La actividad adyuvante de vacuna de los compuestos de la memoria descriptiva está respaldada por los siguientes ensayos biológicos:

a) ensayo ELISPOT de IFN- γ de ratón [antígeno gD_t de HSV2]; b) linfocitos T CD4 multifuncionales analizadas por tinción intracelular FACS [antígeno gD_t de HSV2]; c) ELISA de IgG, IgG1 e IgG2c específicas para el antígeno [antígeno gD_t de HSV2]; d) ensayo ELISPOT de IFN- γ de ratón [antígeno pp65 de CMV]; e) linfocitos T CD4 multifuncionales analizadas por tinción intracelular FACS [antígeno pp65 de CMV]; f) ELISA de IgG, IgG1 e IgG2a específicas para el antígeno [antígeno pp65 de CMV]; g) citotoxicidad *in vivo*.

Durante la descripción de los ensayos, generalmente:

Se han utilizado las siguientes abreviaturas: TLR7L = ligando del receptor de tipo Toll 7; i.m. = intramuscular; gD_t = glucoproteína D terminal del genoma de HSV2; HSV2 = virus del herpes simple 2; h = horas; t.a. = temperatura ambiente; CpG-B = oligonucleótido que contiene motivo(s) de dinucleótidos CG de la clase B; CpG-C = oligonucleótido que contiene motivo(s) de dinucleótidos CG de la clase C; CFSE = éster succinimidílico de carboxifluoresceína; CMV = citomegalovirus; pp65 = poliproteína 65; v:v = volumen por volumen

Los datos son representativos de 2 a 3 experimentos.

Preparación de la muestra utilizando el antígeno de gD_t de HSV2

Se inmunizaron ratones CB6F1 de 8-9 semanas de edad i.m. en el día 0 y 14 con 10 µg de antígeno de gD_t de HSV2 (aminoácidos 25-281) al que se añadió como adyuvante los Ejemplos 6, 7 y 8 («ACVT-03», «ACVT-01» y «ACVT-02», respectivamente), 4 ratones por grupo. Los ejemplos 6, 7 y 8 se administraron de manera que la dosis de TLR7L administrada por ratón fuese de 20 µg (en 100 µL. A efectos comparativos, se inmunizó un grupo de ratones con antígeno de gD_t formulado en AddaVax (InVivogen) al 50% v:v, una emulsión de escualeno de aceite en agua comercializada equivalente en composición a MF59, la emulsión de escualeno con licencia comercial de Novartis utilizada en la vacuna FLUAD y 20 µg del oligodesoxinucleótido CpG-C 2395 (InVivogen). Se ha observado previamente que esta composición de CpG + AddaVax induce fuertes respuestas de linfocitos T en ratones y se utilizó como control positivo. Se inmunizó un grupo de ratones con el Ejemplo de referencia 10 («ACVT») mezclado simplemente con el Ejemplo 2 como comparación de la actividad adyuvante entre la simple mezcla de un TLR7L soluble con una emulsión y el suministro de TLR7L integrado en las microgotas de aceite de la emulsión preparadas por el método de los Ejemplos 6 a 8. En el día 28, los ratones se sacrificaron por desangramiento y se recolectaron los bazo.

a) Ensayo ELISPOT de IFN-γ de ratón

Los esplenocitos se estimularon en placas ELISPOT durante 24 h con péptidos gD_t (superposición de 15-mer por 11 que abarcan toda la secuencia de gD_t). Las células formadoras de puntos se exploraron y analizaron usando el analizador CTL ImmunoSpot (Cellular Technologies Limited). En la Fig. 1, los tres Ejemplos de 6 a 8 indujeron respuestas IFN-γ más altas que la formulación CpG/AddaVax. En la Fig. 2, los esplenocitos se agruparon en igual medida entre los 4 ratones dentro de cada grupo y a continuación, se unieron a microesferas magnéticas anti-CD4 (Miltenyi) y los linfocitos T CD4 se eliminaron mediante MACS (clasificación de células activadas magnéticamente) para producir poblaciones de esplenocitos que tuvieron <1,0% de CD4⁺ y, por lo tanto, contuvieron predominantemente linfocitos T CD8. Estas poblaciones de células también se utilizaron en el ensayo ELISPOT para detectar respuestas de linfocitos T con especificidad por CD8. Dos de las formulaciones que incorporaron conjugados de TLR7L-escualeno, los Ejemplos 6 y 8 («ACVT-03» y «ACVT-02», respectivamente), indujeron respuestas de linfocitos T CD8 más altas que la formulación de CpG/AddaVax o la mezcla de TLR7L + Ejemplo de referencia 10.

b) Linfocitos T CD4/8 multifuncionales analizados por tinción intracelular FACS

Los esplenocitos se agruparon en igual medida entre los 4 ratones dentro de cada grupo, se estimularon durante 6 h con una agrupación de péptidos gD_t + GolgiPlug (BD Biosciences), a continuación se tiñeron para detectar marcadores de la superficie celular utilizando anticuerpo de rata anti-CD3e de ratón-BV421, anticuerpo de rata anti-CD4 de ratón PerCP-Cy5.5, anticuerpo de rata anti-CD8a de ratón APC-H7 (BD Biosciences) y reactivo de tinción azul Live/Dead (Invitrogen), y después se fijaron con Cytotfix al 2% (BD Biosciences). Las células se resuspendieron en tampón de permeabilización BD Perm Wash (BD Biosciences), se incubaron 30 minutos a t.a. y a continuación se tiñeron con un combinado que contenía IFN-γ-APC, IL-2-PE, GM-CSF y TNF-α Alexa 488 (BD Biosciences). La adquisición (100 000 eventos/muestra) se realizó en un citómetro LSR2 de BD Biosciences utilizando el software FACS DIVA. El análisis de subconjuntos y de selección booleana (para linfocitos T multifuncionales) se realizó utilizando el software FLOWJO (TreeStar, Menlo Park, CA). En la Fig. 3, los datos se presentan como % de subconjuntos positivos para citocinas dentro de poblaciones de linfocitos T seleccionados para CD4 o CD8. Los tres Ejemplos de 6 a 8 demostraron una inducción equivalente o superior de linfocitos T CD4 multifuncionales. Aunque con una magnitud menor que en el Ejemplo 7, el preparado adyuvante del Ejemplo 8 indujo un porcentaje mayor de linfocitos T CD4 triple positivo IFN-γ⁺ TNF-α⁺ IL-2⁺ así como también del subconjunto IFN-γ⁺ TNF-α⁺. La Fig. 4 muestra que cuando la población de linfocitos T se selecciona en CD3⁺ CD8⁺, el Ejemplo 7 induce la respuesta con la mayor magnitud de células que expresan citocinas CD8⁺, aunque la mayoría son solo IL-2⁺, mientras que el Ejemplo 8 induce subconjuntos detectables de IFN-γ⁺ IL-2⁺ y GM-CSF⁺ IFN-γ⁺.

c) ELISA de IgG, IgG1 e IgG2c específicas para el antígeno

Se aisló el suero de las muestras del sacrificio por desangramiento el día 28 y a continuación se analizaron mediante ELISA para detectar inmunoglobulinas específicas para gD_t-HSV. El antígeno gD_t-HSV2 se utilizó para recubrir placas ELISA a lo que siguió una incubación con seis diluciones en serie 1:3 comenzando con 1:50 de muestras de suero de ratones individuales para unirse a IgG específica de gD_t. Los anticuerpos de detección biotinilados específicos para IgG, IgG1 e IgG2c se utilizaron a continuación como segundos pasos, a lo que siguió HRP-estreptavidina, sustrato y lectura a 450 nm en un lector de placas ELISA. Los ejemplos 7 y 8 indujeron niveles de títulos de IgG anti-gD_t comparables a los del grupo CpG/AddaVax (Fig. 5). Los ejemplos 7 y 8 también indujeron una mayor proporción de subtipos IgG2c:IgG1 que CpG/AddaVax, lo que denota la inducción de una respuesta de Th1 robusta.

Preparación de muestras utilizando antígeno pp65 de CMV

Se inmunizaron ratones BALB/c de 8-9 semanas de edad i.m. en el día 0 y 14 con 10 µg de antígeno pp65 de CMV al que se añadió como adyuvante con el Ejemplo 9, 5 ratones por grupo. El ejemplo 9 se administró de manera que la dosis de TLR7L administrada por ratón hubiera sido de 10 µg (en 100 µL). A efectos comparativos, se inmunizó un grupo de ratones con antígeno pp65 formulado en AddaVax (InVivogen) al 50% v:v, una emulsión de escualeno de aceite en agua comercializada equivalente en composición a MF59, con y sin 20 µg del oligodesoxinucleótido CpG-C 2395 o 20 µg del oligodesoxinucleótido CpG-B 1826 (ambos InVivogen). Se había observado previamente que estas composiciones de CpG + AddaVax inducían fuertes respuestas de linfocitos T en ratones y se utilizaron como controles positivos. Un grupo de ratones se inmunizó con el Ejemplo de referencia 11 («ME0») mezclado con el TLR7L del Ejemplo 2 como una comparación de la actividad adyuvante entre la simple mezcla de un TLR7L soluble con una emulsión y el suministro de TLR7L integrado en las microgotas de aceite de la emulsión de acuerdo con la preparación del Ejemplo 9. En el día 21, los ratones se sacrificaron por desangramiento y se recolectaron los bazos.

d) Ensayo ELISPOT de IFN-γ de ratón

Los esplenocitos se estimularon en placas ELISPOT durante 24 h con péptidos pp65 (superposición de 15-mer por 11 que abarcan toda la secuencia de pp65). Las células formadoras de puntos se exploraron y analizaron usando el analizador CTL ImmunoSpot (Cellular Technologies Limited). La Fig. 6 demuestra que el Ejemplo 9 («ME7») indujo respuestas de IFN-γ más altas que las formulaciones de CpG/AddaVax. Además, la simple mezcla de TLR7L soluble + el Ejemplo de referencia 11 ejerció respuestas de inducción de linfocitos T deficientes. Los esplenocitos se agruparon en igual medida entre los 5 ratones dentro de cada grupo y a continuación, se unieron a microesferas magnéticas anti-CD4 (Miltenyi) y los linfocitos T CD4 se eliminaron mediante MACS (clasificación de células activadas magnéticamente) para producir poblaciones de esplenocitos que tuvieron <1,0% de CD4+ y, por lo tanto, contuvieron predominantemente linfocitos T CD8. Estas poblaciones de células también se utilizaron en el ensayo ELISPOT para detectar respuestas de linfocitos T con especificidad por CD8 en la Fig. 7. El Ejemplo 9 indujo una respuesta de linfocitos T CD8 comparable a la formulación de CpG/AddaVax y una respuesta mucho más elevada que la mezcla de TLR7L + el Ejemplo de referencia 11.

e) Linfocitos T CD4/8 multifuncionales analizados por tinción intracelular FACS

Los esplenocitos se agruparon en igual medida entre los 5 ratones dentro de cada grupo, se estimularon durante 6 h con una agrupación de péptidos pp65 + Brefeldina A (BD Biosciences), a continuación se tiñeron para detectar los marcadores de la superficie celular utilizando anticuerpo de rata anti-CD3e de ratón-BV510, anticuerpo de rata anti-CD4 de ratón APC-Cy7, anticuerpo de rata anti-CD8a de ratón BV711 (BD Biosciences) y reactivo azul que se puede someter a fijación Live/Dead (Invitrogen), y después se fijaron con Cytofix al 2% (BD Biosciences). Las células se resuspendieron en tampón de permeabilización BD Perm Wash (BD Biosciences), se incubaron 30 minutos a t.a. y a continuación se tiñeron con un combinado que contenía IFN-γ-BV605, IL-2-PerCP-Cy5.5, y TNF-α-BV421 (BD Biosciences). La adquisición (100 000 eventos/muestra) se realizó en un citómetro LSR2 de BD Biosciences utilizando el software FACS DIVA. El análisis de subconjuntos y de selección booleana (para linfocitos T multifuncionales) se realizó utilizando el software FlowJo (TreeStar, Menlo Park, CA). Los datos se presentan en la Fig. 8 como % de subconjuntos positivos para citocinas dentro de poblaciones de linfocitos T seleccionados para CD4 o CD8. El Ejemplo 9 demostró una inducción superior de linfocitos T CD4 multifuncionales en comparación con las formulaciones de CpG/AddaVax o TLR7L/Ejemplo de referencia 11. Cuando se selecciona en la población de linfocitos T CD3+ CD8+ en la Fig. 9, el Ejemplo 9 induce una respuesta de magnitud comparable de células multifuncionales que expresan citocinas CD8+ respecto a CpG/AddaVax.

f) ELISA de IgG, IgG1 e IgG2c específicas para el antígeno

Se aisló el suero de las muestras del sacrificio por desangramiento el día 21 y a continuación se analizaron mediante ELISA para detectar inmunoglobulinas específicas para gD_t-HSV. El antígeno gD_t-HSV2 se utilizó para recubrir placas ELISA a lo que siguió una incubación con seis diluciones en serie 1:3 comenzando con 1:50 de muestras de suero de ratones individuales para unirse a IgG específica de gD_t. A continuación, se utilizaron anticuerpos de detección biotinilados específicos para IgG de ratón como un segundo paso, seguidos por HRP-estreptavidina, sustrato y lectura a 450 nm en un lector de placas ELISA. CpG-C/AddaVax, el Ejemplo de referencia 11 y el Ejemplo 9 indujeron los niveles más elevados de títulos de IgG específicas para gD_t totales (Fig. 10). La mezcla de TLR7L soluble + Ejemplo de referencia 11 fue subóptima en comparación con la formulación integrada del Ejemplo 9. También se analizaron muestras de suero con anticuerpos secundarios específicos para los subtipos IgG1 e IgG2a (Fig. 11). CpG / AddaVax y el Ejemplo 9, pero no TLR7L + AddaVax, lograron relaciones de IgG2a:IgG1 superiores, indicativas de respuestas robustas de Th1.

g) Ensayo de citotoxicidad *in vivo*

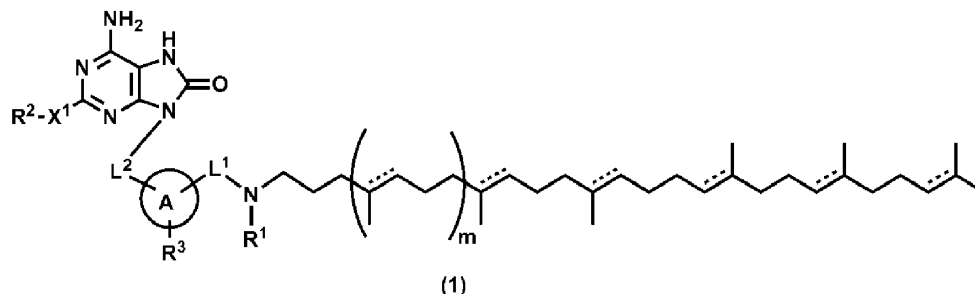
Se utilizaron esplenocitos BALB/c vírgenes para generar dos poblaciones de células diana. Una población se cargó con colorante CFSE 10 µM y 2 µg/mL de péptidos superpuestos pp65 mientras que la otra se cargó con colorante CFSE 1 µM y 2 µg/mL de péptidos superpuestos gp350 de EBV (de un antígeno irrelevante), para proporcionar normalización para efectos específicos de pp65. Se inyectaron proporciones equivalentes de ambas poblaciones diana en el día 28 por vía i.v. a través de la vena de la cola en ratones que habían sido inmunizados dos veces (día 0, 14)

5 con 10 µg de Ag pp65-CMV al que se le habían añadido como adyuvante 20 µg de CpG formulado en AddaVax al 50% v:v o con el Ejemplo 9. Los ratones receptores se sacrificaron 18-24 h más tarde, se aislaron los esplenocitos y posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo para detectar la señal de CFSE, en la que se utilizaron señales de CFSE brillantes y tenues para distinguir las poblaciones diana. La destrucción diana específica para pp65 se normalizó respecto a la destrucción diana específica para gp350 mediante la fórmula % de destrucción específica = $(1 - \% \text{ células CFSE}^{\text{elevado}} / \% \text{ células CFSE}^{\text{bajo}}) \times 100$. La Fig. 12 indica que los ratones inmunizados con pp65 al que se había añadido como adyuvante el Ejemplo 9 demostraron una citotoxicidad de las células diana cargadas con pp65 comparable a la de los ratones inmunizados con CpG + AddaVax.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la fórmula (1) o su sal farmacéuticamente aceptable:

[Quím. 1]



donde

L¹ y L² son independientemente alquileo;

R¹ es un átomo de hidrógeno o alquilo;

R² es alquilo sustituido opcionalmente;

R³ es un átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, alquilo o alcoxi;

X¹ es un enlace sencillo, átomo de oxígeno, átomo de azufre, SO, SO₂, NR⁴ o CONR⁴;

R⁴ es un átomo de hidrógeno o alquilo;

A es carbociclo aromático monocíclico, o heterociclo aromático de 5 o 6 miembros que incluye de 1 a 4 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en de 1 a 4 átomos de nitrógeno, un átomo de oxígeno y un átomo de azufre;

m es 0 o 1; y

un enlace descrito por

[Quím. 2]

representa independientemente un enlace sencillo o un enlace doble.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o su sal farmacéuticamente aceptable, donde

L¹ es alquileo C₁₋₄;

L² es alquileo C₁₋₄;

R¹ es un átomo de hidrógeno o alquilo C₁₋₄;

R² es alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente por de 1 a 4 grupos que pueden ser idénticos o diferentes, seleccionados entre hidroxilo, átomo de halógeno, alquilo C₁₋₆, haloalquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₆, haloalcoxi C₁₋₆, amino sustituido opcionalmente con uno o dos alquilo C₁₋₆ que pueden ser idénticos o diferentes, y carboxi;

R³ es un átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, alquilo C₁₋₄ o alcoxi C₁₋₄;

X¹ es un enlace sencillo, átomo de oxígeno, átomo de azufre, SO, SO₂, NR⁴ o CONR⁴; y

R⁴ es hidrógeno o alquilo C₁₋₄.

3. El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o su sal farmacéuticamente aceptable, donde R² es alquilo C₁₋₆ sustituido opcionalmente con de 1 a 3 grupos que pueden ser idénticos o diferentes seleccionados entre hidroxilo, átomo de halógeno, alcoxi C₁₋₆ y haloalcoxi C₁₋₆.

4. El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o su sal farmacéuticamente aceptable, donde A es un anillo de benceno o anillo de piridina.

5. El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con la reivindicación 4, o su sal farmacéuticamente aceptable, donde A es un anillo de benceno.

6. El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o su sal farmacéuticamente aceptable, donde L² es metileno.

7. El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o su sal farmacéuticamente aceptable, donde R² es alquilo C₁₋₄, hidroxialquilo C₁₋₄ o alcoxi C₁₋₄-alquilo C₁₋₄.

8. El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o su sal farmacéuticamente aceptable, donde L¹ es alquileo C₁₋₃ y R¹ es un átomo de hidrógeno o alquilo C₁₋₃.

9. El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o su sal farmacéuticamente aceptable, donde todos los enlaces descritos por

[Quím. 3]

representan un enlace simple, o todos los enlaces descritos por [Quím. 4]

5 representan un doble enlace.

10. El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o su sal farmacéuticamente aceptable, donde R¹ es un átomo de hidrógeno o metilo.

11. El compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con la reivindicación 1, o su sal farmacéuticamente aceptable, donde

L¹ es metileno;

L² es metileno;

R¹ es un átomo de hidrógeno o metilo;

15 R² es alquilo C₁₋₆, alcoxi C₁₋₃-alquilo C₂₋₄ o alquilo C₂₋₆ sustituido con de 1 a 4 grupos hidroxilo, donde dos o más grupos hidroxilo están unidos a diferentes átomos de carbono;

R³ es un átomo de hidrógeno, alquilo C₁₋₃, alcoxi C₁₋₃ o un átomo de halógeno;

X¹ es un enlace sencillo, átomo de oxígeno, NR⁴ o CONR⁴;

R⁴ es un átomo de hidrógeno o alquilo C₁₋₃;

20 A es un anillo de benceno o anillo de piridina; y

todos los enlaces descritos por

[Quím. 5]

representan un enlace simple, o todos los enlaces descritos por [Quím. 6]

representan un doble enlace.

12. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en:

30 6-amino-2-butoxi-9-[4-(((4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexaen-1-il)(metil)amino)metil]bencil]-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, o su sal farmacéuticamente aceptable;

6-amino-9-[4-(((4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexaen-1-il)(metil)amino)metil]bencil]-2-(2-metoxietoxi)-7,9-dihidro-8H-purin-8-ona, o su sal farmacéuticamente aceptable; y

35 6-amino-2-(2,3-dihidroxipropoxi)-9-[4-(((4E,8E,12E,16E,20E)-4,8,12,17,21,25-hexametilhexacosa-4,8,12,16,20,24-hexaenil)metilamino)metil]fenil]metil]-7H-purin-8-ona,

o su sal farmacéuticamente aceptable.

13. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o su sal farmacéuticamente aceptable.

14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 donde la composición farmacéutica es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno como un componente oleoso, Span® 85 (trioleato de sorbitán) y Poloxámero 188.

15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 donde la composición farmacéutica es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno como un componente oleoso, L-α-fosfatidilcolina y Poloxámero 188.

16. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14 o 15 donde la emulsión de aceite en agua comprende microgotas con un tamaño medio de partícula de 10-1000 nm ± 10 nm.

17. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 que comprende además un antígeno.

18. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, donde el antígeno es un antígeno derivado de un patógeno o es un antígeno tumoral.

19. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, donde el antígeno es un péptido o una proteína.

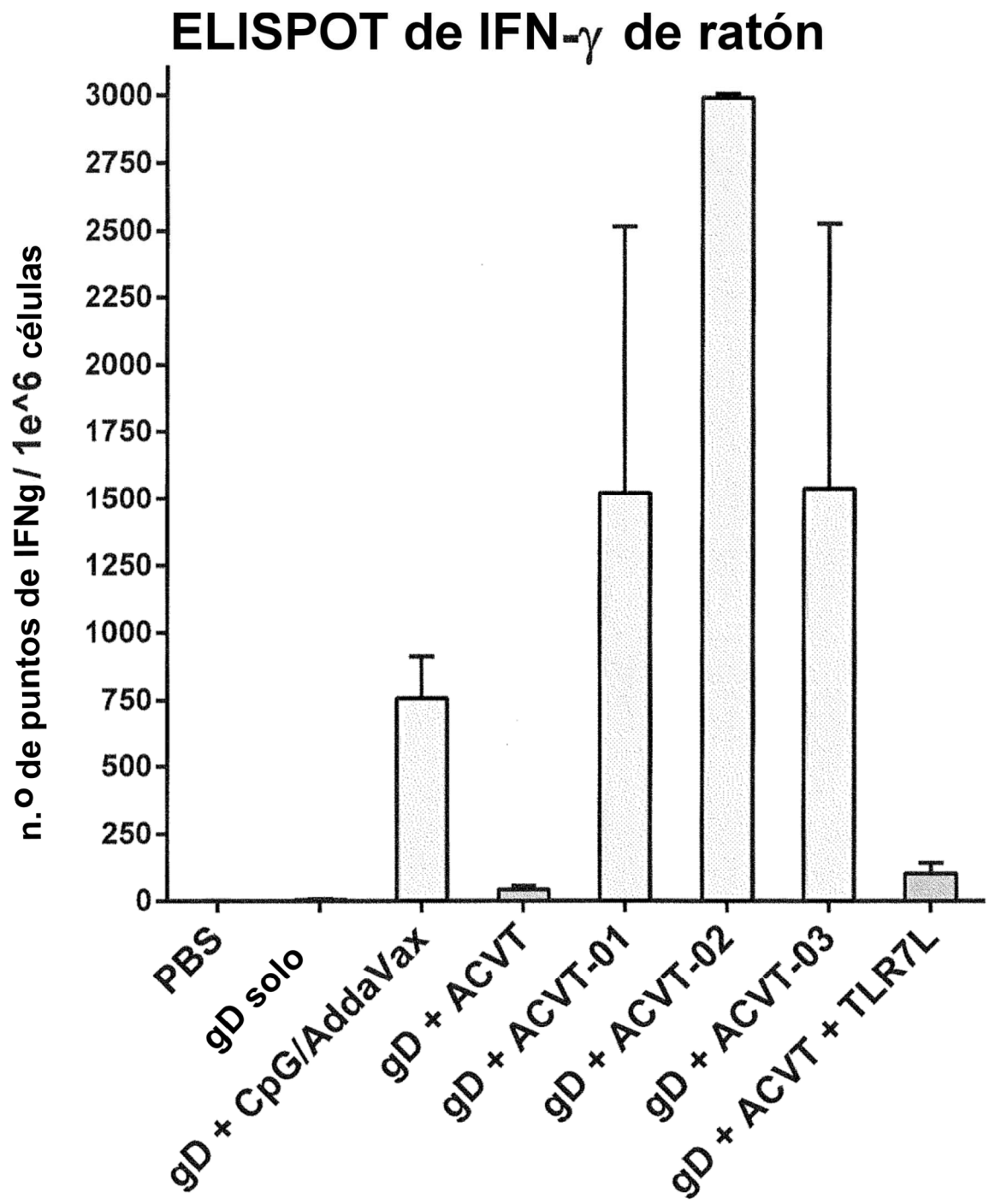
20. Un adyuvante de vacuna que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o su sal farmacéuticamente aceptable.

21. Un compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o su sal farmacéuticamente aceptable para su uso en terapia.

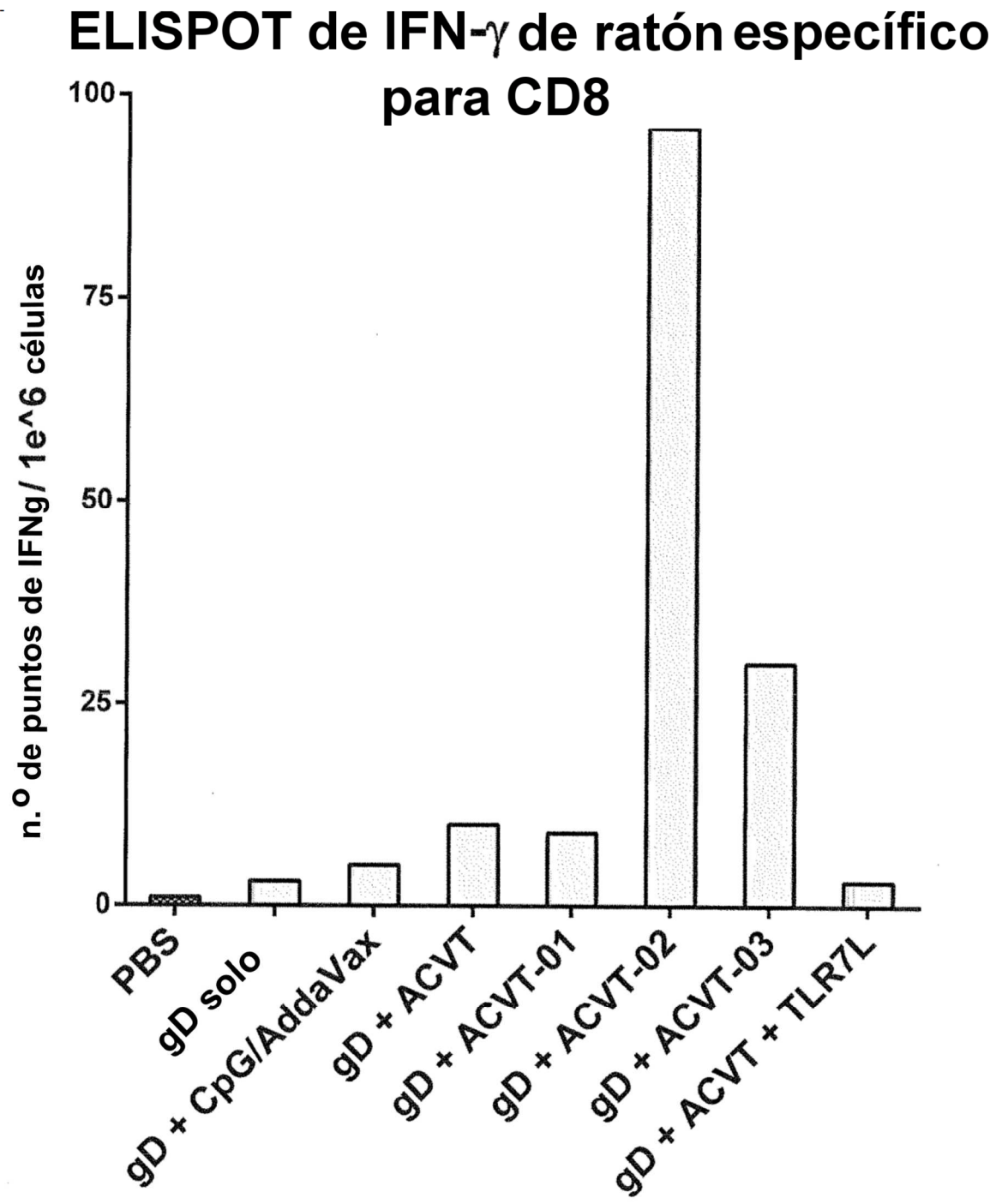
22. Un compuesto representado por la fórmula (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o su sal farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer.

5

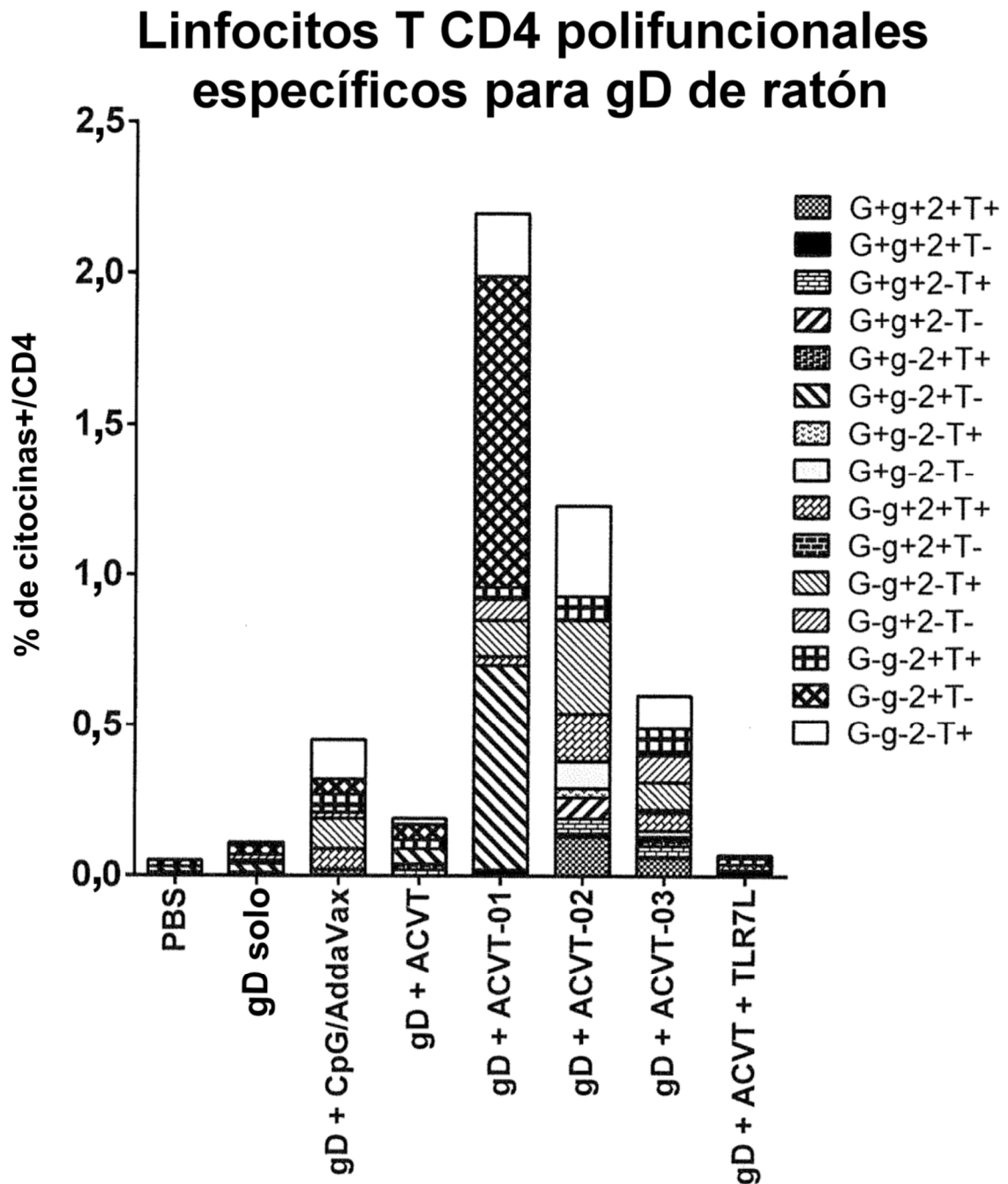
[Fig. 1]



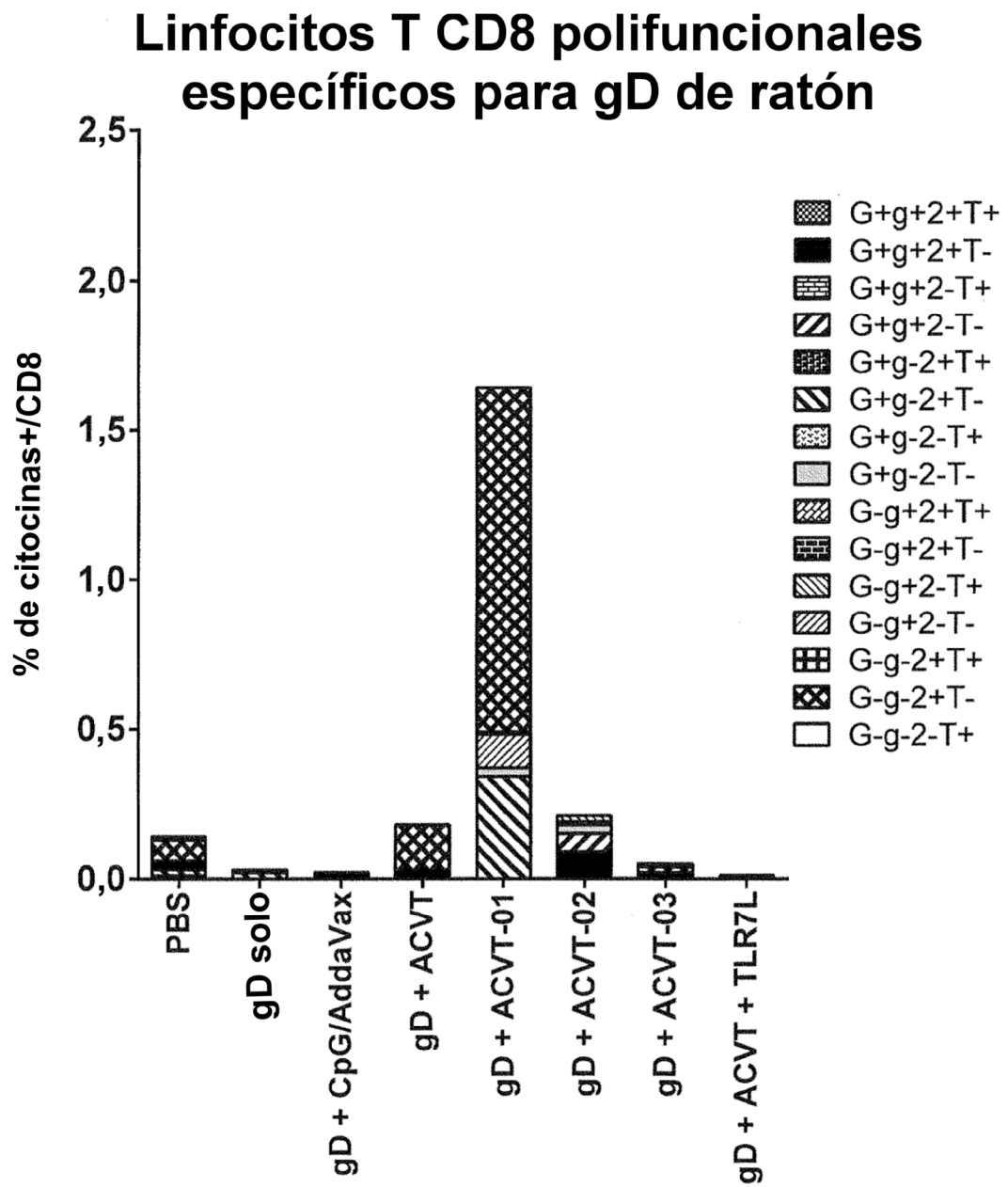
[Fig. 2]



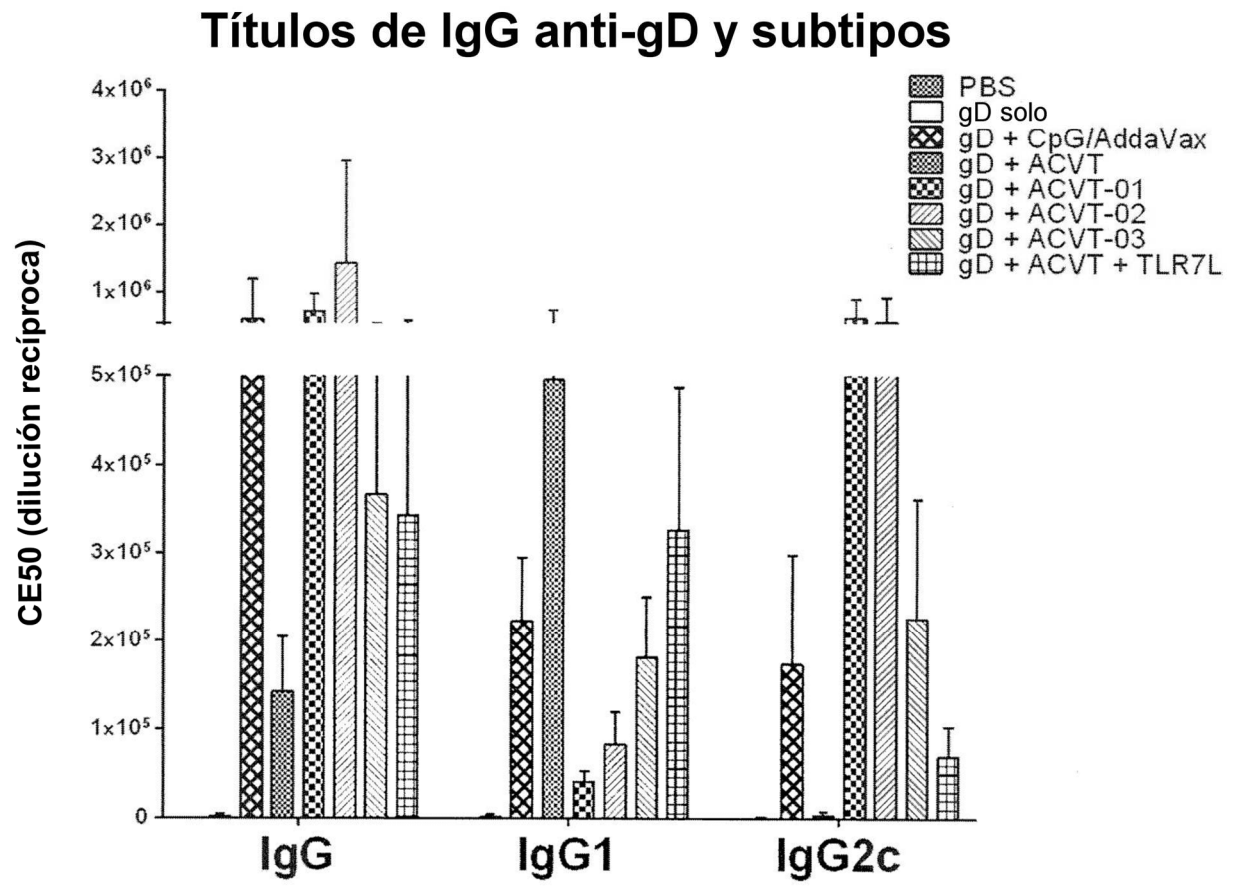
[Fig. 3]



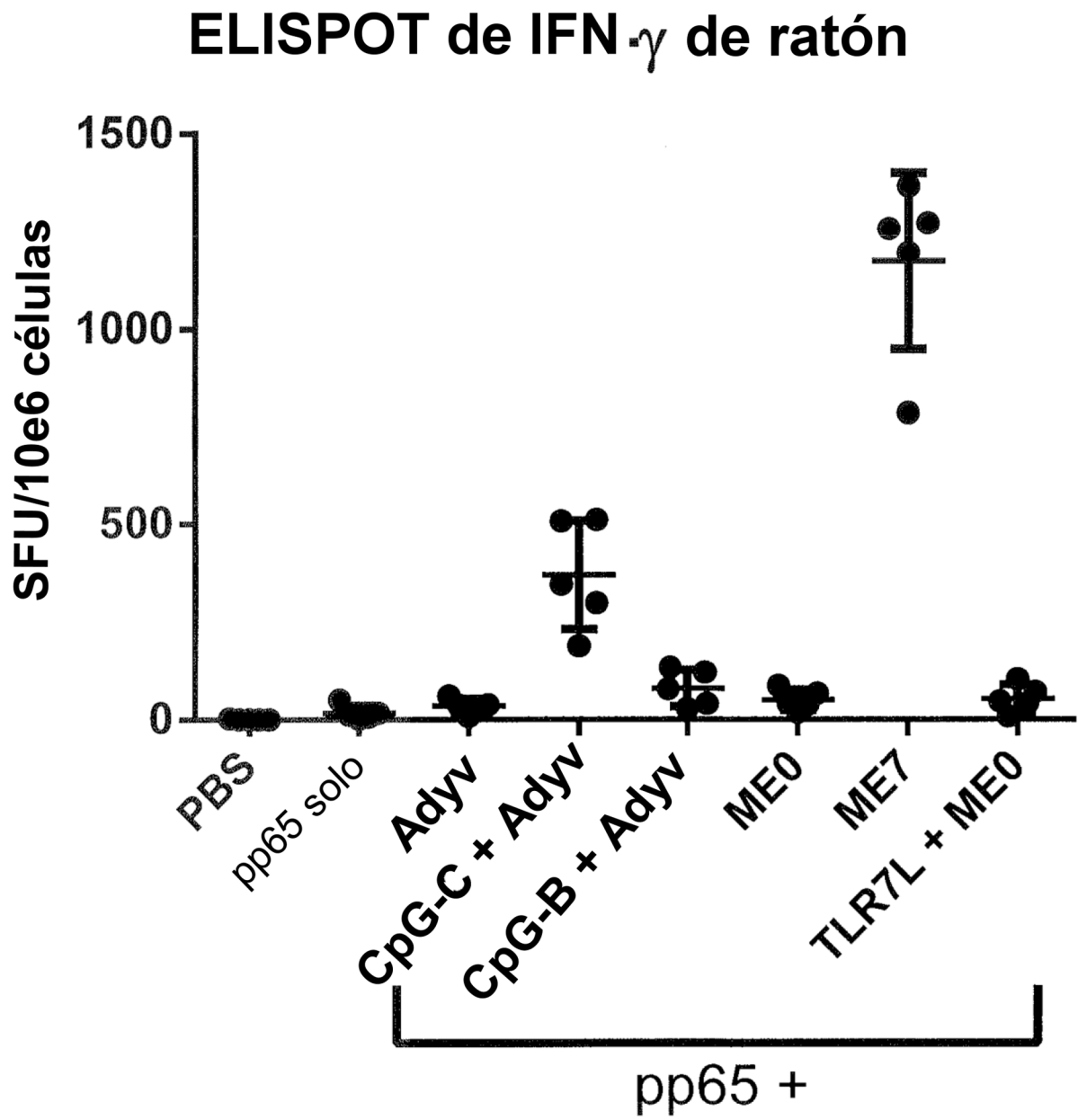
[Fig. 4]



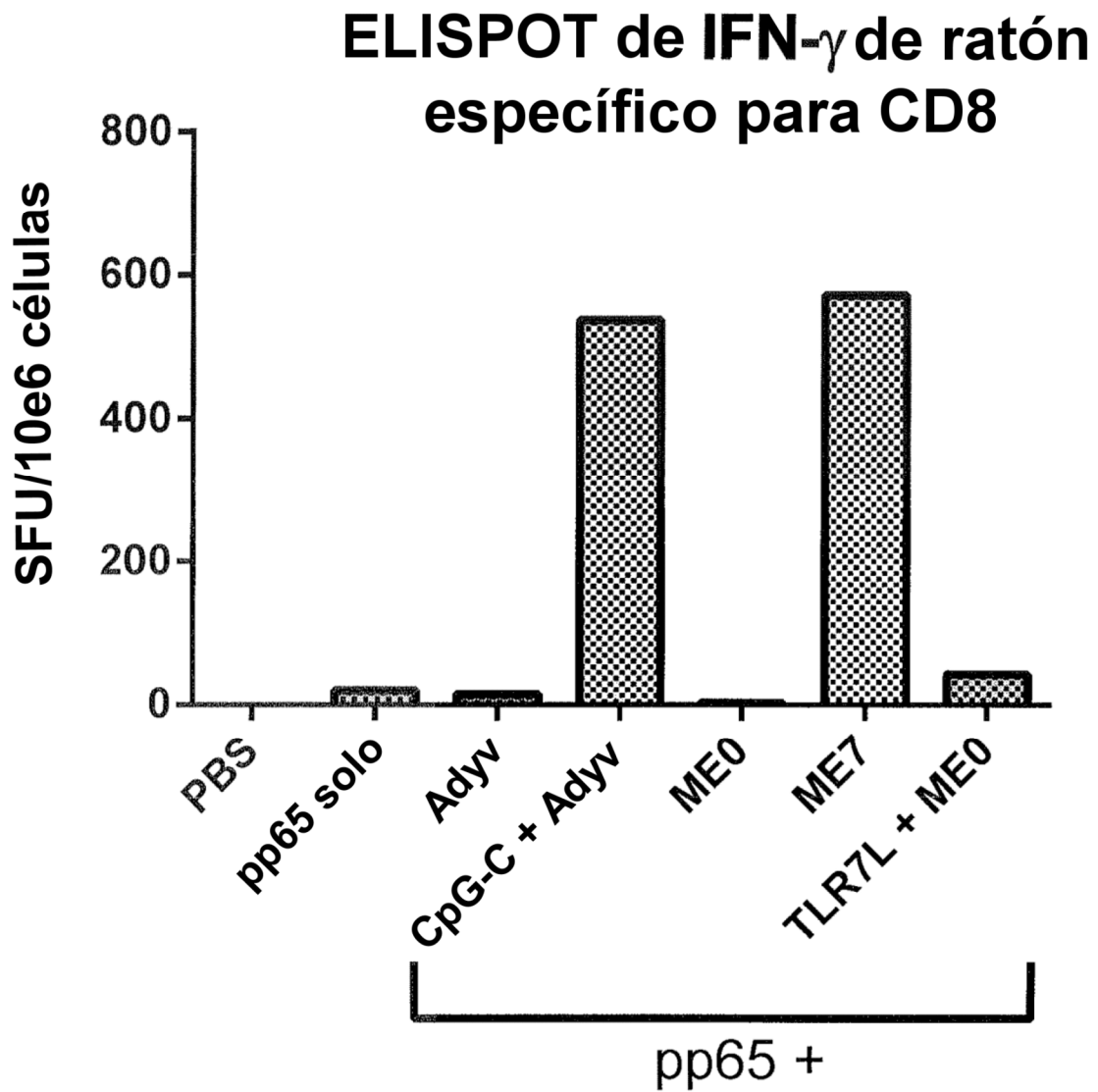
[Fig. 5]



[Fig. 6]

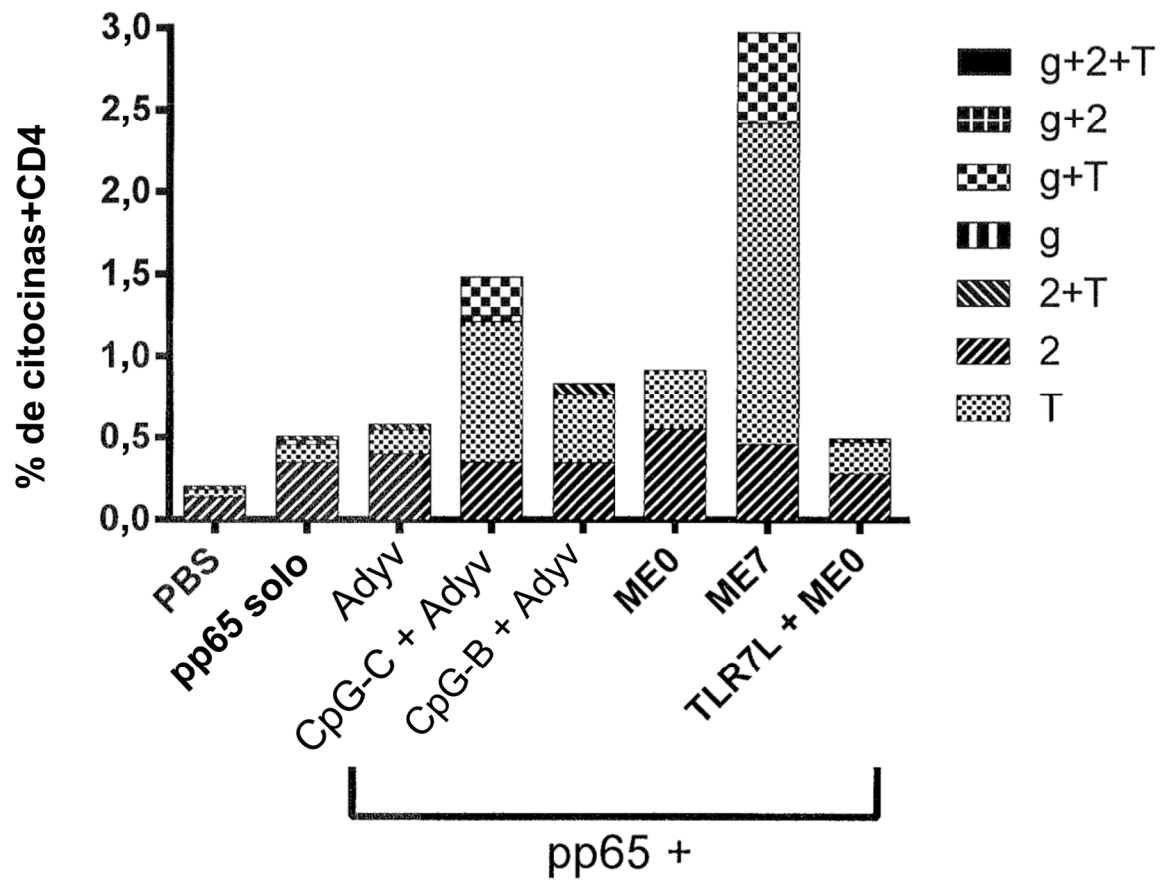


[Fig. 7]



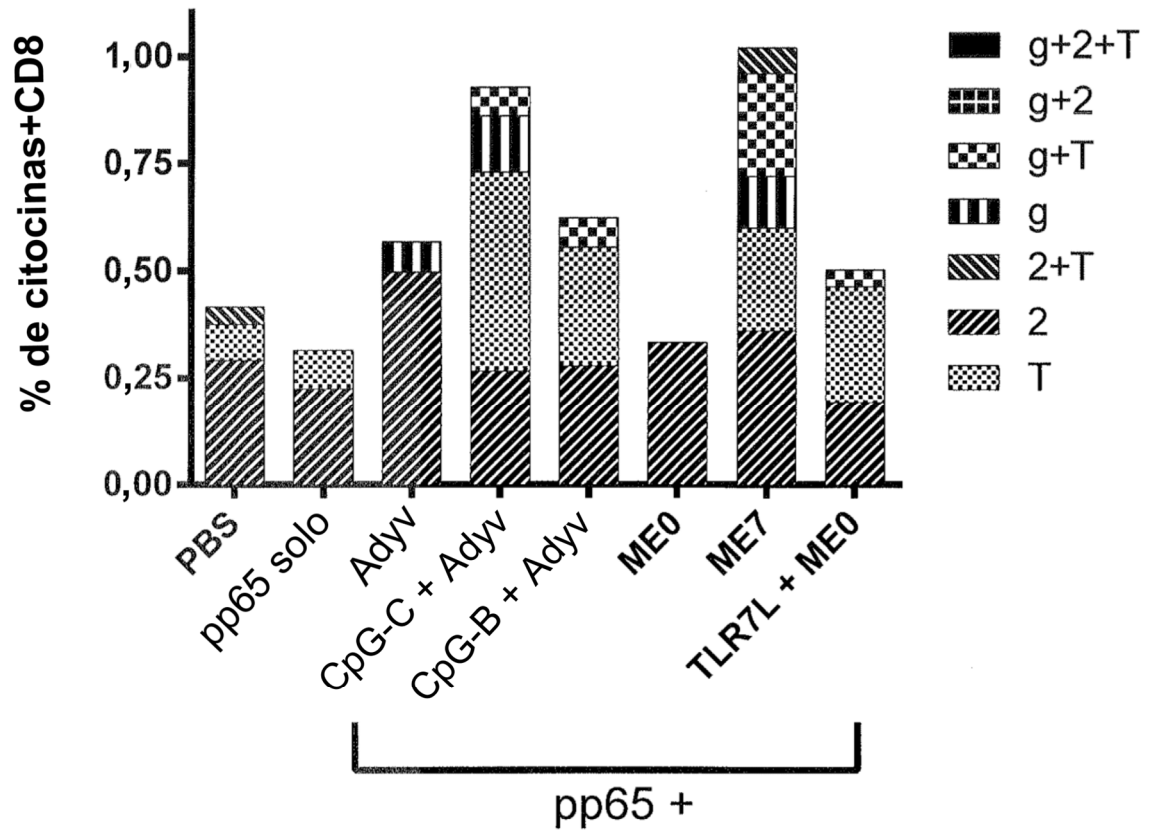
[Fig. 8]

Linfocitos T CD4 multifuncionales específicos para pp65 de ratón

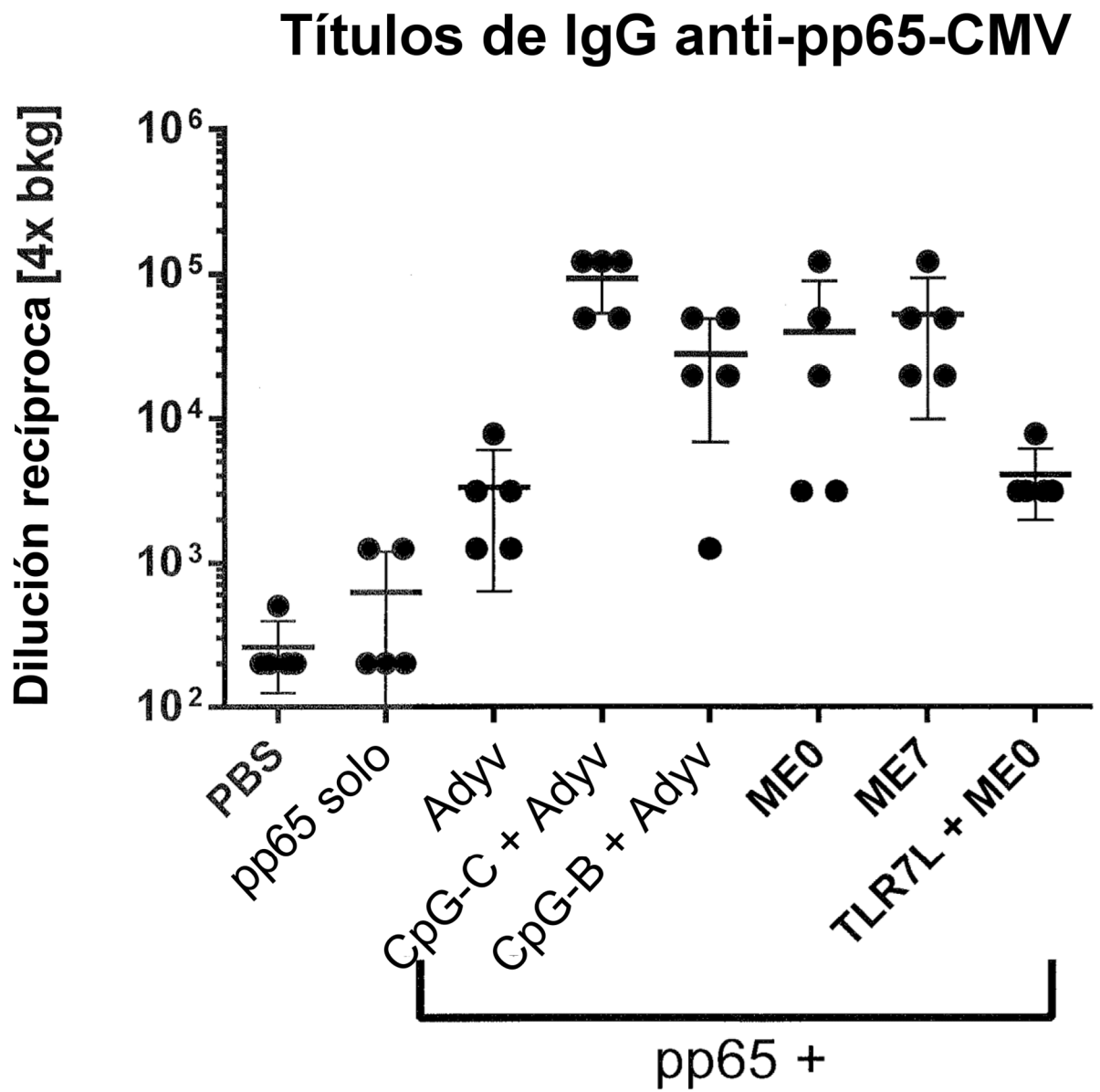


[Fig. 9]

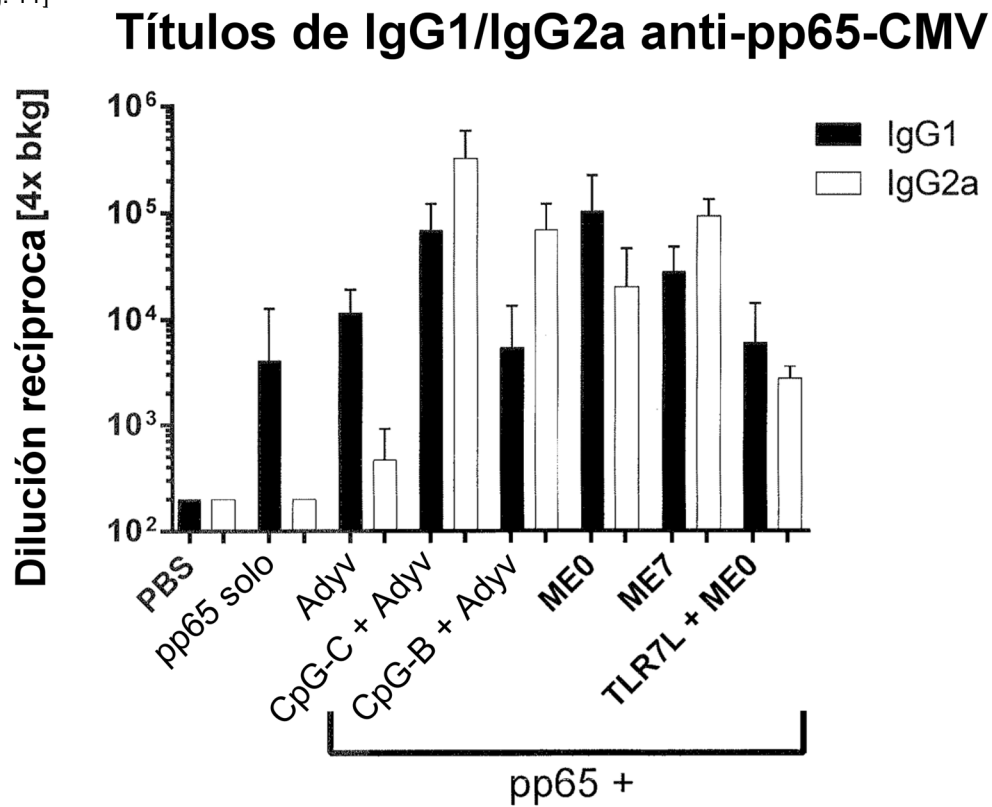
Linfocitos T CD8 multifuncionales específicos para pp65 de ratón



[Fig. 10]



[Fig. 11]



[Fig. 12]

