



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 814**

51 Int. Cl.:
A61K 31/4015 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
C07D 207/452 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02801965 .1**
86 Fecha de presentación : **24.10.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1438042**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.07.2004**

54 Título: **Compuestos de polimaleimida y su uso médico.**

30 Prioridad: **25.10.2001 GB 0125658**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es: **SSL International plc.**
205 Science Park, Milton Road
Cambridge, Cambridgeshire CB4 0GZ, GB

72 Inventor/es: **Solanki, Suren;**
Potter, William Duncan y
Anderson, Lorraine

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 269 814 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).

ES 2 269 814 T3

DESCRIPCIÓN

Compuestos de polimaleimida y su uso médico.

5 La presente invención se refiere al uso de derivados de polimaleimida como agentes microbicidas, en particular se refiere al uso de derivados de polimaleimida, preferiblemente compuestos de bismaleimida, en el tratamiento de infecciones microbianas del tracto reproductor, tales como infecciones bacterianas, fúngicas, protozoarias y virales.

10 A pesar de los esfuerzos para reducir los niveles de infecciones de transmisión sexual (STIs), por ejemplo proporcionando información y educación pertinentes y promoviendo el uso de anticonceptivos de barrera, tales como preservativos, el nivel de tales infecciones se está incrementando en todo el mundo. Por lo tanto, continúa existiendo un requerimiento de agentes terapéuticos seguros y eficaces para la profilaxis y el tratamiento de STIs, en particular agentes que puedan administrarse o aplicarse fácilmente en el momento del contacto sexual. Las maleimidias son una clase bien conocida de compuestos químicos.

15 Se sabe que los derivados de maleimida tienen una amplia variedad de utilidades y encuentran aplicación en los campos biológico y médico, así como en el uso industrial general, por ejemplo en la preparación de polímeros y tintas.

20 Así, por ejemplo, USP 31.139.225 (United States Vitamin and Pharmaceutical Corporation) describe maleimidobetaínas que se dice que tienen actividad antimicrobiana y antiparasitaria así como actividad farmacológica, en particular la reducción de colesterol sérico.

25 German ALS 1.140.192 (United States Rubber Company) describe una nueva bismaleimida con un puente de CH₂-O-CH₂ y su uso en la vulcanización, la reticulación de polímeros y como fungicida para tomates.

30 USP 4.876.358 (Texaco Inc.) describe nuevas bismaleimidias que tienen un puente de (poli)oxietileno, para usar en la preparación de polímeros.

35 USP 5.552.396 y WO 97/19080 (Eli Lilly) describen clases de bisindolmaleimidias puenteadas en N,N que se dice que son inhibidores de proteína quinasa C, y que son útiles para el tratamiento de diabetes, isquemia, inflamación, trastornos del SNC, enfermedad cardiovascular, enfermedad dermatológica y cáncer.

40 USP 5.380.764 (Goedecke AG) describe bisindolmaleimidias que se dice que son inhibidores de proteína quinasa C útiles para tratar enfermedades del corazón o los vasos sanguíneos, procesos inflamatorios, alergias, cáncer y daño degenerativo del SNC, enfermedades del sistema inmunitario y enfermedades virales, incluyendo enfermedades provocadas por retrovirus HTLV -I, -II, -III.

45 WO 96/09406 (el Gobierno de los Estados Unidos de América, representado por la Secretaría del Departamento de Salud y Servicios Humanitarios) describe el uso de disulfuros, maleimidias y una variedad de otros compuestos aceptores de electrones al inactivar HIV-1 y otros retrovirus.

50 Igarashi y otros, J. Industrial Microbiology, 6 (1990) pp 223-225, presentan que diversas N-alquilmaleimidias muestran actividad antibacteriana y antifúngica.

55 Se ha encontrado que los derivados de polimaleimida de fórmula (I) inhiben la infectividad del virus HIV-1 humano. Tales maleimidias de fórmula (I) son útiles en la profilaxis y/o el tratamiento de una variedad de infecciones de transmisión sexual y otras infecciones que afectan al sistema reproductor, incluyendo los órganos reproductores y el tracto reproductor.

60 En un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de un derivado de polimaleimida de fórmula (I) en la fabricación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones microbianas, en particular infecciones de transmisión sexual y otras infecciones que afectan al sistema reproductor.

65 Las STIs microbianas y otras infecciones que afectan al sistema reproductor incluyen infecciones bacterianas, fúngicas, protozoarias y virales.

Las infecciones bacterianas incluyen chancroide, clamidiasis, gonorrea, sífilis y vaginosis bacteriana. Agentes causales de tales infecciones incluyen *H. ducreyi*, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoea*, *T. pallidum* y bacterias anaerobias tales como *G. vaginalis*.

60 Las infecciones fúngicas incluyen candidiasis (conocida comúnmente como moniliasis) que está provocada por *C. albicans*.

65 Infecciones protozoarias incluyen tricomoniasis, provocada por *T. vaginalis*.

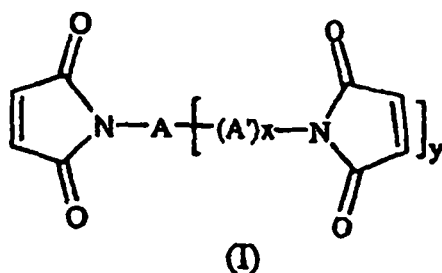
STIs virales incluyen las provocadas por un virus seleccionado de HIV (SIDA), HSV (herpes simple), HPV (papilomavirus humano) y HBV (hepatitis B).

ES 2 269 814 T3

Por lo tanto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de polimaleimida de fórmula (I) en la fabricación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de una infección bacteriana, fúngica o protozoaria del sistema reproductor. El término compuesto o derivado de polimaleimida incluye todos los derivados, sales y maleimidas sustituidas, incluyendo bismaleimidas y polimaleimidas opcionalmente sustituidas. No se refiere a compuestos de monomaleimida.

La presente invención también proporciona el uso de un derivado de maleimida de fórmula (I) en la fabricación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de una infección viral.

El compuesto de maleimida puede estar representado preferiblemente por la fórmula general (I):



en la que

A está representado por $(R^1)_n-(R^2)_p-(R^3)_q$, en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 se selecciona independientemente de:

un grupo alifático acíclico que tiene de 1-20 átomos de carbono;

un grupo polialquilenglicol que tiene un peso molecular medio en el intervalo de 100 a 1000;

un grupo alifático cíclico que tiene de 4-20 átomos de carbono;

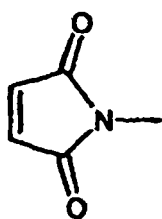
un grupo hidrocarbonado aromático monocíclico o policíclico que tiene de 6-18 átomos de carbono de anillo;

un grupo heterocíclico no aromático que tiene de 3 a 8 átomos de carbono; o

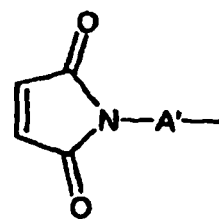
un grupo heterocíclico aromático monocíclico o policíclico que tiene de 5 a 20 átomos de anillo;

y n, p y q representan cada uno 0 ó 1, de modo que la suma de $n+p+q = 1-3$;

o A está sustituido por uno o más grupos seleccionados independientemente de:



y



en donde A' , que puede ser igual que o diferente de A, representa un grupo $(R^1)_n-(R^2)_p-(R^3)_q$, en el que R^1 , R^2 , R^3 , n, p y q son como se definen anteriormente y en donde x es 0 ó 1 e y es de 1 a 6;

o una sal, un éster u otro derivado fisiológicamente equivalente del mismo.

En los compuestos de fórmula (I), se prefiere que el número total de átomos de los restos A y A' no supere 50.

En los compuestos de fórmula (I) anteriores, un grupo o resto alifático acíclico puede ser alquilo ramificado o no ramificado, grupo alquilo que puede estar opcionalmente interrumpido por uno o más átomos de oxígeno; alqueno; alquino; cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, nitro, $-C(O)R^4$, $-CO_2R^4$, $-OR^4$, $-SR^4-SOR^4$, $-SO_2R^4$, $-NR^4R^5$, $-C(O)NR^4R^5$; en donde R^4 y R^5 representan independientemente hidrógeno, alquilo C_{1-8} , arilo o aril-alquilo (C_{1-8}).

ES 2 269 814 T3

Para los propósitos de la presente invención, los grupos alquilo pueden tener de 1 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 15 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a 10 átomos de carbono. Los grupos alquenoilo pueden tener de 2 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 15 átomos de carbono, más preferiblemente de 2 a 10 átomos de carbono. Los grupos alquinoilo pueden tener de 2 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 15 átomos de carbono, más preferiblemente de 2 a 10 átomos de carbono.

Un grupo polialquilenglicol puede ser un polietilenglicol (PEG) o un polipropilenglicol que puede estar representado por las fórmulas $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{OH}$, $-(\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2)_m\text{OH}$ o $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_m\text{OH}$, en las que m está en el intervalo de 4 a 20. Se apreciará que los polialquilenglicoles son generalmente una mezcla de longitudes de cadena y por lo tanto convencionalmente se describen en términos de peso molecular medio y valores medios de m . Así, por ejemplo, el PEG 200 tiene un peso molecular en el intervalo de 190-210 y un valor medio de $m=4$ (The Merck Index, Undécima edición).

El arilo es fenilo opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, nitro, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^6$, $-\text{CO}_2\text{R}^6$, $-\text{OR}^6$, $-\text{SR}^6$, $-\text{SOR}^6$, $-\text{SO}_2\text{R}^6$, $-\text{NR}^6\text{R}^7$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^6\text{R}^7$, en donde R^6 y R^7 representan independientemente hidrógeno o alquilo C_{1-8} .

Un grupo o resto alifático cíclico puede ser cicloalquilo o cicloalquenoilo, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, ciano, nitro, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^4$, $-\text{CO}_2\text{R}^4$, $-\text{OR}^4$, $-\text{SR}^4$, $-\text{SOR}^4$, $-\text{SO}_2\text{R}^4$, $-\text{NR}^4\text{R}^5$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^4\text{R}^5$; en donde R^4 y R^5 son como se definen anteriormente.

Los grupos cicloalquilo de la presente invención pueden tener de 3 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 3 a 10 átomos de carbono, más preferiblemente de 3 a 6 átomos de carbono. Los grupos cicloalquenoilo de la presente invención pueden tener de 3 a 20 átomos de carbono, preferiblemente de 3 a 10 átomos de carbono, más preferiblemente de 3 a 6 átomos de carbono.

Los grupos y restos hidrocarbonados aromáticos incluyen, por ejemplo, anillos insaturados monocíclicos; bicíclicos o tricíclicos condensados; opcionalmente sustituidos; de hasta 18 átomos de carbono, tales como fenilo y naftilo, y anillos bicíclicos o tricíclicos parcialmente saturados tales como tetrahidronaftilo.

Los grupos aromáticos también incluyen anillos aromáticos conectados, tales como un grupo bifenilo. Los anillos aromáticos también pueden estar conectados por heteroátomos, por ejemplo O, S o NR^4 . Ejemplos de sustituyentes que pueden estar presentes sobre un grupo o resto aromático incluyen uno o más de halógeno, alquilo, haloalquilo, ciano, nitro, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^4$, $-\text{CO}_2\text{R}^4$, $-\text{OR}^4$, $-\text{SR}^4$, $-\text{SOR}^4$, $-\text{SO}_2\text{R}^4$, $-\text{NR}^4\text{R}^5$ o $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^4\text{R}^5$. Los sustituyentes en el anillo aromático están preferiblemente en la posición orto o para con respecto al grupo maleimido.

Un grupo o resto heterocíclico aromático puede estar insaturado o parcialmente saturado, por ejemplo un anillo aromático heterocíclico de 5 ó 6 miembros opcionalmente sustituido que puede contener de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de O, N y S. El anillo heterocíclico puede estar condensado opcionalmente a uno o más anillos fenílicos. Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen así furilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, oxazinilo, tiazolilo, imidazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, piridilo, triazolilo, triazinilo, piridazilo, pirimidinilo, pirazolilo, indolilo, indazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, benzimidazolilo, benzoxazolilo, benzoxazinilo, quinoxalinilo, quinolinilo, quinazolinilo, cinolinilo, benzotiazolilo, piridopirrolilo. Ejemplos de sustituyentes que pueden estar presentes sobre un grupo aromático heterocíclico incluyen uno o más de halógeno, oxo, nitro, ciano, alquilo, haloalquilo, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^4$, $-\text{CO}_2\text{R}^4$, $-\text{OR}^4$, $-\text{SR}^4$, $-\text{SOR}^4$, $-\text{SO}_2\text{R}^4$, $-\text{NR}^4\text{R}^5$ o $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^4\text{R}^5$, en donde R^4 y R^5 son como se definen anteriormente. Derivados parcialmente saturados de los grupos heteroarilo mencionados anteriormente incluyen 3-pirrolina y 1,2-dihidroquinolina.

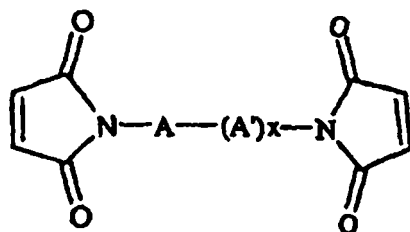
Grupos heterocíclicos no aromáticos incluyen pirrolidinilo, tetrahydrofurilo, tetrahidrotienilo y piperidinilo.

En los compuestos de fórmula (I), R^1 representa preferiblemente un grupo hidrocarbonado aromático, por ejemplo fenilo o naftilo; o un grupo heterocíclico aromático, por ejemplo tienilo o acridina. Sustituyentes opcionalmente presentes en el grupo fenilo están preferiblemente en la posición orto o para (con relación al maleimido) y pueden seleccionarse, por ejemplo, de amino, halógeno, por ejemplo cloro, alquilo C_{1-4} , nitro, fenoxi y fenilamino.

Cuando A representa fenilo, los restos maleimido están preferiblemente en la posición para relativa entre sí. Cuando A representa bifenilo, los enlaces entre los grupos maleimido y fenilo y el enlace entre los dos grupos fenilo también están preferiblemente en las posiciones para.

Una clase preferida de compuestos para usar de acuerdo con la invención es la de derivados de bismaleimida representados por la fórmula (II):

65



(II)

en la que A, A¹ y x son como se definen anteriormente.

En los compuestos de fórmula (II), x representa preferiblemente 0 y A es como se define anteriormente.

En el grupo A, R¹, R², R³, n, p y q se seleccionan preferiblemente de modo que A representa un grupo alquilo C₁₋₈, opcionalmente interrumpido por un átomo de oxígeno;

un grupo polialquilenglicol que tiene un peso molecular medio en el intervalo de 100 a 1000; o

un grupo fenilo; o

n y q son cada uno preferiblemente 1, p representa 0 ó 1, R¹ y R³ representan cada uno preferiblemente fenilo y, cuando p es 1, R² representa preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₈, opcionalmente interrumpido por un átomo de oxígeno; o

un grupo polialquilenglicol que tiene un peso molecular medio en el intervalo de 100 a 1000.

Cuando A representa fenilo, los restos maleimido están preferiblemente en la posición para relativa entre sí. Cuando A representa bifenilo, los enlaces entre los grupos maleimido y fenilo y el enlace entre los dos grupos fenilo también están preferiblemente en las posiciones para.

Los derivados de maleimida para usar de acuerdo con la presente invención están disponibles comercialmente o pueden prepararse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

Un derivado de maleimida para usar de acuerdo con la presente invención puede administrarse como el único ingrediente activo o puede administrarse en combinación con uno o más de otros derivados de maleimida como los definidos aquí y/o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. En este contexto, "en combinación" significa que los compuestos pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente, y puede haber un intervalo de tiempo entre la administración de los dos o más compuestos. Otros agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con uno o más derivados de maleimida incluyen agentes antibacterianos, antifúngicos y antivirales.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula (I) y preferiblemente el uso de un compuesto de fórmula (II) para la profilaxis y/o el tratamiento de infecciones retrovirales del tracto reproductor, en particular infección por HIV.

El tercer aspecto de la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un compuesto como el definido para el primer aspecto y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Para usar en el tratamiento de STIs, los compuestos pueden formularse para administración a los órganos reproductores o el tracto reproductor (vaginal, cervical o uterina) o para administración rectal, bucal u oral. Para la administración a los órganos reproductores o el tracto reproductor o la administración rectal los compuestos pueden formularse usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, pueden formularse como cremas, geles, incluyendo geles termorreversibles, lubricantes, pesarios, tabletas espumantes, espumas en aerosol, pulverizaciones, jeringas o películas. Los compuestos pueden incorporarse en formulaciones de liberación sostenida, por ejemplo mediante microencapsulación, formulación con un material bioadhesivo, tal como policarbófilo, u otros medios convencionales. Los geles, las cremas y los pesarios pueden, de acuerdo con la circunstancia, administrarse con un aplicador apropiado. Las formulaciones, en particular geles, cremas y pesarios, pueden envasarse con un aplicador apropiado para facilitar la administración.

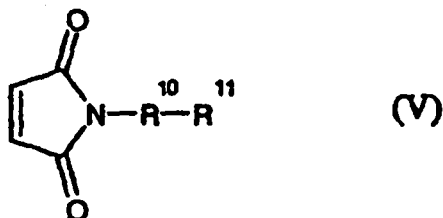
Los compuestos y las composiciones para usar de acuerdo con la presente invención también pueden incorporarse en dispositivos anticonceptivos. Así, por ejemplo, pueden incorporarse en dispositivos vaginales, cervicales o uterinos tales como esponjas o anillos vaginales y diafragmas o usarse para lubricar y/o revestir preservativos.

Para la administración bucal y oral los compuestos pueden formularse como grageas, tabletas masticables, obleas, lavados bucales y similares.

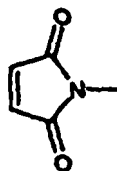
ES 2 269 814 T3

Para el uso de acuerdo con la presente invención, un derivado de maleimida puede administrarse en una dosificación en el intervalo de 10-1000 mg, por ejemplo de 30 a 1000 mg.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un compuesto de fórmula (V)



en la que R¹¹ es



30 y R¹⁰ es alquilo C₂₋₁₀, preferiblemente en donde el alquilo tiene 2, 3, 4 ó 5 átomos de carbono, o un grupo R²⁰-R²¹-R²² en el que R²⁰ es arilo, preferiblemente fenilo;

35 R²¹ es -(OCH₂CH₂)_n-, en donde n representa de 3 a 15, preferiblemente n es uno de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13; y R²³ es alquilo C₁₋₂₀, o R₂₁ es -(OCH₂-CH₂)₁₅

y R²² es un grupo O-R²³ en el que R²³ es arilo.

Compuestos preferidos del cuarto aspecto se indican en la tabla siguiente.

40

Compuesto número	Estructura
45 1	
50 55 2	

60

65

ES 2 269 814 T3

El cuarto aspecto de la invención también se refiere a sales, ésteres, amidas o profármacos de los compuestos de fórmula (V).

Los compuestos del cuarto aspecto pueden sintetizarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En particular, PEG de la longitud de cadena apropiada se convierte inicialmente en el derivado aminoarílico usando síntesis química convencional. Un ejemplo de tal síntesis química incluye el acoplamiento de PEG con p-fluoronitrobenzenceno en presencia de hidruro sódico y DMF para producir un resto aril-PEG substituido con nitro. El resto aril-PEG substituido con nitro se reduce a continuación con un agente reductor tal como paladio/carbono para formar el compuesto amínico requerido. El compuesto amínico puede convertirse a continuación en el compuesto de maleimida de fórmula (V) mediante un número de métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo de tal método incluye hacer reaccionar la amina con anhídrido maleico.

El quinto aspecto de la invención proporciona un compuesto de fórmula (V) como el definido en el cuarto aspecto de la invención para usar en medicina. El compuesto de fórmula (V) se proporciona preferiblemente para la prevención o el tratamiento de infecciones microbianas que afectan al tracto reproductor. Los compuestos pueden usarse para prevenir o tratar enfermedades de transmisión sexual y otras infecciones que afectan al tracto reproductor.

Todas las características preferidas de los diferentes aspectos de la invención se aplican unas a otras haciendo los cambios necesarios.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos:

Prueba biológica

La Figura 1 indica medidas de la densidad óptica frente a diversas concentraciones de los compuestos de la invención.

Métodos

Ensayo de Chlamidia

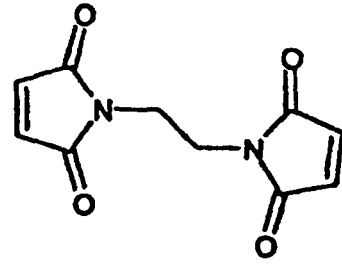
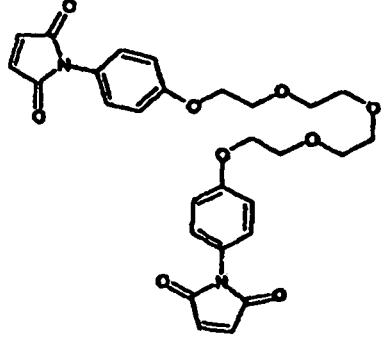
Se añadió *Chlamydia trachomatis* purificada (250 ml) a 250 μ l de cada concentración de compuesto y las mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los tubos se centrifugaron a continuación (15000 rpm, 15 minutos), el sobrenadante se decantó y el nódulo se lavó con MEM libre de suero (con 0,5 ml). Esta etapa se repitió y el nódulo resultante se resuspendió en MEM (en 0,5 ml) y se inoculó en cultivos en "shell vial" (cubreobjetos) confluentes de células de McCoy. Los cultivos se centrifugaron (3000 rpm, 1 hora a 37°C) y se incubaron durante 2 horas más antes de cambiarse a MEM con suero de ternero fetal al 10%, 1 μ g/ml de cicloheximida, 0,5% de glucosa añadida, vancomicina, estreptomycinina y anfotericina B (Fungizone). Los cultivos se incubaron durante 68 horas, se fijaron en metanol y se tiñeron con yodo de Lugol. Se incluyeron 3 réplicas de cada control positivo (con y sin DMSO) así como 2 controles de células no inoculadas. Cada cultivo en cubreobjetos se examinó usando un objetivo de baja potencia (10 aumentos) para asegurar que las inclusiones estuvieran uniformemente distribuidas y se seleccionaron 5 campos de alta potencia (40 aumentos) aleatoriamente de diferentes áreas del cubreobjetos. Se contaron las inclusiones teñidas con yodo. Cuando no se observaban inclusiones con alta potencia, el cultivo se volvió a examinar bajo baja potencia.

Ensayo Antiviral

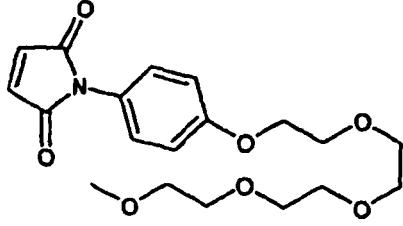
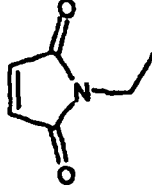
Se unió HIV a la superficie de placas de cultivo celular de 96 pocillos usando 100 μ l de 50 μ g/ml de hidrobromuro de poli-L-lisina (PLL) de peso molecular >300 K durante 1 h a TA. Los pocillos externos se dejaron sin revestir y se rellenaron con 250 μ l de PBS para contrarrestar los efectos de la evaporación. Los pocillos revestidos se lavaron dos veces con PBS y 25 μ l de medio RPMI 1640 que contenía 5×10^3 TCID₅₀ de HIV-1_{RF} se añadieron y se incubaron durante 1 h a TA. Los pocillos se lavaron a continuación dos veces con PBS y se añadieron a los pocillos 25 μ l de concentraciones variables de los compuestos de prueba formados por medio libre de suero (que contenía un 10% constante de DMSO) por cuadruplicado y las placas se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Los pocillos se lavaron de nuevo dos veces con PBS y 50×10^4 células C8166 en un volumen de 300 μ l distribuidos en cada pocillo y las placas se incubaron durante 5 y 6 días, respectivamente. Los días 5 y 6 las células se ensayaron microscópicamente con respecto a la presencia de efecto citopático (formación de sincitios) y se registraron. Para cuantificar el efecto citopático, se añadió XTT, que es metabolizado por células viables pero no muertas, y la absorbancia se leyó a 450 nm después de una incubación de 3-4 h a 37°C.

Compuestos de Prueba

Los siguientes compuestos de la invención se probaron como se indica en los métodos anteriores.

Compuesto número	Estructura
1	
2	

Los compuestos comparativos, etilmaleimida y PEG(5)PhMA, también se usaron en los métodos anteriores.

Compuesto comparativo 3 (PEG(5)PhMA)	
Compuesto comparativo 4 (Etilmaleimida)	

Resultados

Ensayo de Clamidia: Tabla 1

No había una diferencia aparente entre el número de inclusiones encontrado en células de McCoy expuestas a clamidia tratada transitoriamente con medio (DMEM) o clamidia tratada con vehículo (DMSO, 10% final), sugiriendo que esta concentración de DMSO no compromete la capacidad de la clamidia para infectar células de McCoy. La exposición transitoria de clamidia a los compuestos 4, 1, 3 y 2 daba como resultado una inhibición dependiente de la dosis de la infección de células de McCoy con clamidia. La etilmaleimida (4) es menos activa que su equivalente de bismaleimida, la etilbismaleimida (1). De forma similar, PEG(5)-fenilmaleimida (3) es menos activa que su equivalente de PEG-bis(fenilmaleimida), PEG(5)-bisfenilmaleimida (2).

ES 2 269 814 T3

TABLA 1

Efecto del Tratamiento Transitorio con Maleimidias sobre la Infección por Clamidia de Células de McCoy In Vitro. La clamidia se trató con cada una de las maleimidias indicadas durante 5 minutos y el compuesto se retiró mediante centrifugación. Las células de McCoy se expusieron a continuación a la clamidia pretratada con compuesto durante 68 horas y las inclusiones se contaron después de la tinción de las células con yodo de Lugol

TRATA- MIENTO	RÉPLICAS (M)	CONC. DE TRABAJO (M)	CONC. FINAL (M)	INCLUSIONES TENIDAS CON YODO/CAMPO							COMEN- TARIOS
				F1	F2	F3	F4	F5	CONTEO TOTAL/ CAMPOS	CONTEO MEDIO/ CAMPO	
Célula No Inoculada Control				0	0	0	0	0	0	0	
Célula No Inoculada Control				0	0	0	0	0	0	0	Sin inclusiones observadas
Medio (DMEDM) Células Inoculadas con Clamidia				70	50	68	58	63	309	62	
Control de Vehículo Células Inoculadas con Clamidia (DMSO al 10%)				75	71	61	84	75	366	73	
4	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	Sin inclusiones observadas
	2	0,8	0,4	0	0	0	0	0	0	0	Sin inclusiones observadas
	3	0,04	0,02	1	11	6	4	2	24	5	Sin inclusiones observadas
1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	Sin inclusiones observadas
	2	0,8	0,4	0	0	0	0	0	0	0	Sin inclusiones observadas
	3	0,04	0,02	0	0	0	0	0	0	0	6 inclusiones observadas en todo el cubreobje- tos
3	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	15 inclusiones observadas en todo el cubreobje- tos
	2	0,8	0,4	4	7	5	8	4	28	6	
	3	0,04	0,02	12	24	9	29	22	96	19	
2	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	6 inclusiones observadas en todo el cubreobje- tos
	2	0,8	0,4	1	2	2	1	5	11	2	
	3	0,04	0,02	3	2	6	5	7	23	5	

ES 2 269 814 T3

Ensayo Antiviral

Resultados

5 Una determinación del efecto citopático viral se realizó microscópicamente los días 5 y 6, pero el punto final del experimento era el día 6 cuando el nivel de infección por virus (según se determinaba mediante viabilidad celular) se cuantificaba mediante el uso de XTT. Existía una buena correlación entre las evaluaciones microscópicas para la formación de sincitios y los valores de DO obtenidos mediante XTT el día 6 y la presencia de DMSO al 10% en el medio usado para tratar los virus no parecía provocar ninguna diferencia en los resultados.

10 Los resultados de este experimento indican que el compuesto virucida más potente de la serie era el compuesto 1 ($IC_{50} = 1,0$ mM), seguido en orden de actividad por 2 (casi 50% de inhibición a 1 mM), 4 ($IC_{50} = 1,9$ mM) y 3, que no mostraba actividad virucida en concentraciones de hasta 1,0 mM.

TABLA 2

Compuesto	Concentración (mM)	Evaluación de sincitios día 5 (pocillos por cuadruplicado)				Evaluación de sincitios día 6 (pocillos por cuadruplicado)			
1	1	++	++	0	0	++	++/+++	0	0
	0,3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	0,1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	0,03	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	0,01	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	0,003	++++	++++	++++		++++	++++	++++	++++
2	1	+++	++	++	0	+++	+++	++	0
	0,3	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	0,1	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
	0,03	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

ES 2 269 814 T3

Compuesto	Concentración (mM)	Evaluación de sincitios día 5 (pocillos por cuadruplicado)				Evaluación de sincitios día 6 (pocillos por cuadruplicado)			
	0,01	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	0,003	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
3	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	0,3	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	0,1	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	0,03	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	0,01	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	0,003	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
4	3	0	0	0	0	0	0	0	+/-
	1	+++	+++ +++		+++	++	++	+++	+++
	0,3	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	0,1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	0,03	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	0,01	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Control del Virus + DMSO		++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Control de Virus + Medio solo		++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Sin Control de Virus		0	0	0	0	0	0	0	0
Clave: 0 = Sin sincitios; + = <10% de sincitios; ++ = 10-25% de sincitios; +++ = 25-50% de sincitios; ++++ = 50-100% de sincitios									

TABLA 3

<i>Lecturas Ópticas Medias a 450 nm</i>									
Conc mM	4	1	2	3	Controles				
3	1,6305	nd	nd	nd	Control de Virus	Control de Virus + DMSO al 10%	Sin Virus	50% de Control	
1	0,5275	1,18075	0,9895	0,52675					
0,3	0,502	0,58525	0,50925	0,50925	0,5091	0,511	1,84955	1,1798	
0,1	0,50475	0,53475	0,49825	0,51175					
0,03	0,4915	0,51425	0,49275	0,50125					
0,01	0,48	0,50275	0,4895	0,5085					
0,003		0,4875	0,48825	0,50175					

nd = no determinado

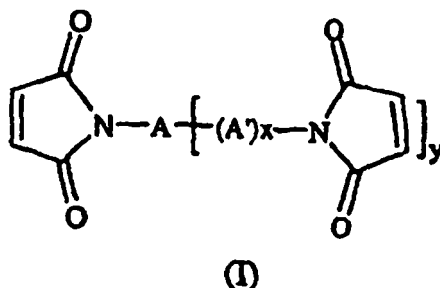
TABLA 4

Compuesto	IC ₅₀ mM
1	1,0
2	~1,0
3	1,9
4	>1,0

La descripción precedente detalla compuestos, composiciones, métodos y usos específicos que pueden emplearse para poner en práctica la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un derivado de polimaleimida en la fabricación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de una infección microbiana que afecta al sistema reproductor, en el que el compuesto de maleimida es un compuesto de fórmula general (I):



en la que

A está representado por $(R^1)_n-(R^2)_p-(R^3)_q$, en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 se selecciona independientemente de:

un grupo alifático acíclico que tiene de 1-20 átomos de carbono;

un grupo polialquilenglicol que tiene un peso molecular medio en el intervalo de 100 a 1000;

un grupo alifático cíclico que tiene de 4-20 átomos de carbono;

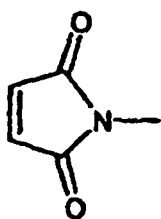
un grupo hidrocarbonado aromático monocíclico o policíclico que tiene de 6-18 átomos de carbono de anillo;

un grupo heterocíclico no aromático que tiene de 3 a 8 átomos de carbono; o

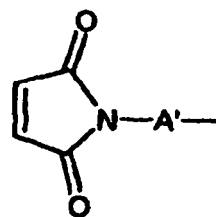
un grupo heterocíclico aromático monocíclico o policíclico que tiene de 5 a 20 átomos de anillo;

y n, p y q representan cada uno 0 ó 1, de modo que la suma de $n+p+q = 1-3$;

o A está substituido por uno o más grupos seleccionados independientemente de:



y



en donde A' , que puede ser igual que o diferente de A, representa un grupo $(R^1)_n-(R^2)_p-(R^3)_q$, en el que R^1 , R^2 , R^3 , n, p y q son como se definen anteriormente y en donde x es 0 ó 1 e y es de 1 a 6;

o una sal o éster del mismo.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la infección es una infección bacteriana, fúngica o protozoaria.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la infección es una infección viral.

4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la infección viral está provocada por un retrovirus, tal como HIV.

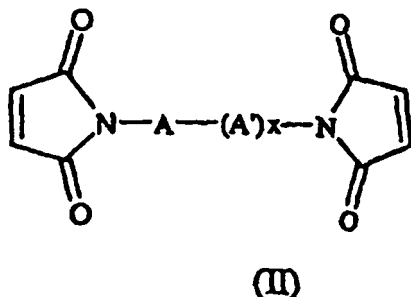
5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la infección es una infección de transmisión sexual.

6. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en el que la maleimida es un compuesto de fórmula (II):

5

10

15



en la que A, A¹ y x son como se definen en la reivindicación 1.

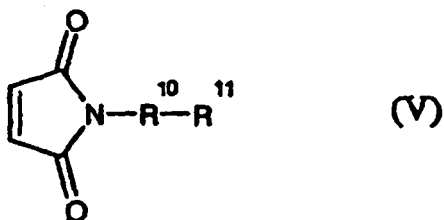
20

7. Formulación farmacéutica que comprende un derivado de maleimida de acuerdo con la reivindicación 1 ó 6.

8. Un compuesto de fórmula (V)

25

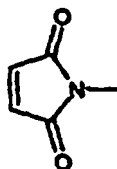
30



35

en la que R¹¹ es

40



45

y R¹⁰ es un grupo R²⁰-R²¹-R²²

en el que R²⁰ es arilo;

50

R²¹ es -(OCH₂CH₂)_n-, en donde n es de 3 a 15;

R²² es un grupo O-R²³ en el que R²³ es alquilo C₁₋₁₀;

o R²¹ es -(OCH₂CH₂)_n-, en donde n es 15;

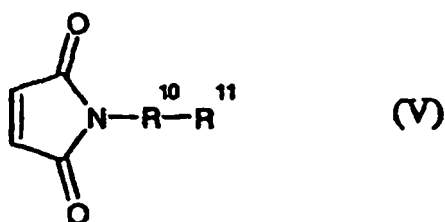
55

R²² es un grupo O-R²³ en el que R²³ es arilo.

9. Un compuesto de fórmula (V)

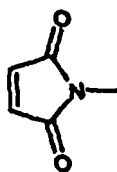
60

65



en la que R¹¹ es

5



10

y R¹⁰ es alquilo C₂₋₁₀ o un grupo R²⁰-R²¹-R²²

en el que R²⁰ es arilo;

15

R²¹ es -(OCH₂CH₂)_n-, en donde n es de 3 a 15;

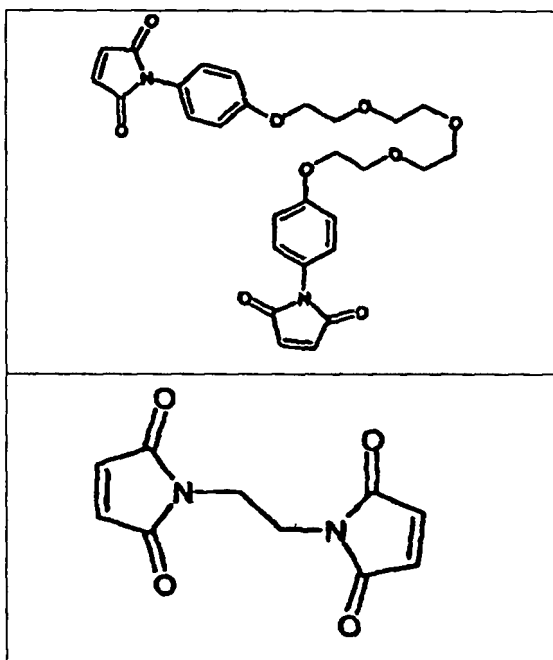
R²² es un grupo O-R²³ en el que R²³ es arilo o alquilo C₁₋₁₀,

para usar en medicina.

20

10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9, seleccionado de

25



30

35

40

45

11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, para prevenir o tratar una infección microbiana que afecta al sistema reproductor.

55

60

65

Figura 1

Gráficas de lecturas ópticas medias para los diversos compuestos

