(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 731 658**

(51) Int. CI.:

A61K 31/519 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A01N 43/90 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2016 E 16188201 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3292867**

(54) Título: **Derivados triazolo(4,5-d)pirimidina para uso en la prevención y tratamiento de infección bacteriana**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2019

(73) Titular/es:

UNIVERSITÉ DE LIÈGE (100.0%)
Place du XX Aout
4000 Liège, BE

(72) Inventor/es:

OURY, CÉCILE y
LANCELLOTTI, PATRIZIO

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

DESCRIPCIÓN

Derivados triazolo(4,5-d)pirimidina para uso en la prevención y tratamiento de infección bacteriana

La presente invención se refiere a un nuevo uso de derivados de triazolo(4,5-d)pirimidina para prevención y tratamiento de infección bacteriana.

Las bacterias están a menudo incriminadas en infecciones asociadas con la atención sanitaria (incluyendo infecciones relacionadas con dispositivos médicos), que provocan morbilidad y mortalidad incrementadas en pacientes, y plantean enormes cargas financieras en los servicios sanitarios. La situación se ha vuelto crítica dado que cada vez más bacterias se están volviendo resistentes a los antibióticos que pertenecen a varias clases tales como penicilinas, meticilinas, carbapenems, cefalosporinas, quinolonas, amonoglicósidos y glicopéptidos, y un número cada vez mayor de infecciones se están volviendo difíciles de curar.

La resistencia incrementada a los antibióticos es un problema de salud pública creciente debido a las limitadas opciones de tratamiento disponibles para estas graves infecciones. En Europa, la resistencia antimicrobiana provoca aproximadamente 25000 muertes cada año. El impacto clínico asociado a la resistencia antimicrobiana se estima que cuesta aproximadamente 1,5 billones de euros por año.

Actualmente, se estima que 700000 muertes son atribuidas a resistencia antimicrobiana globalmente como se publica en Review on AMR, Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations, 2014.

El uso de antibióticos no es seguro especialmente en terapia a largo plazo o terapia de altas dosis. Tal presión medioambiental puede promover la selección de bacterias resistentes, población, que altera la estructura de la población e incrementa el riesgo de transferencia génica horizontal que conduce a la movilidad de genes resistentes dentro del microbioma.

El tratamiento con antibióticos tiene como objetivo tanto las “buenas” como las “malas” bacterias.

La microbiota del sistema gastrointestinal (GI) está compuesta de alrededor de trillones de microorganismos la mayor parte de ellos bacterias. La microbiota y la relación de defensa del receptor es esencial para las funciones metabólicas y fisiológicas que contribuyen a la salud. Al alterar esta relación beneficiosa, los componentes de la dieta, el estrés físico y psicológico, los fármacos pero también los antibióticos incrementan la incidencia de varias enfermedades como la obesidad, inflamación y enfermedades cardiovasculares (CVD). Las CVD siguen siendo la primera causa de muerte en la sociedad industrial con incidencia creciente en otros países.

Por ejemplo, ciertos estudios mostraron una relación directa entre el tratamiento con antibióticos a largo plazo, la alteración de la microbiota del GI y riesgos de aterosclerosis en ratones.

La fuente de infección bacteriana es diversa y hay un gran número de infecciones bacterianas.

Las infecciones provocadas por bacterias gram-positivas representan un mayor impacto sobre la salud pública, no solo en términos de morbidez y mortalidad, sino también en términos de gasto incrementado en el tratamiento e implementación de medidas de control de la infección. El staphylococcus aureus y los enterococos son patógenos establecidos en el medio hospitalario, y su frecuente resistencia a múltiples fármacos complica la terapia.

El Staphylococcus aureus es un importante patógeno responsable de una amplia gama de manifestaciones clínicas que varían de relativamente benignas infecciones de la piel a afecciones mortales tales como endocarditis y osteomielitis. También es una bacteria comensal (que coloniza aproximadamente el 30 por ciento de la población humana).

Han ocurrido dos cambios principales en la epidemiología de S. aureus desde la década de 1990: una epidemia de infecciones de piel y tejido blando asociadas a comunidades (en gran medida motivadas por cepas de S. aureus resistentes a penicilina [MRSA], y un incremento del número de infecciones asociadas a los servicios sanitarios (especialmente endocarditis infecciosa e infecciones de dispositivos protésicos).

Los estafilococos coagulasa negativos (CoNS) son los constituyentes más frecuentes de la flora normal de la piel. Estos organismos son contaminantes comunes en las muestras clínicas así como cada vez más reconocidos como agentes de infección clínicamente significativa, que incluye bacteriemia y endocarditis. Los pacientes con un riesgo particular de infección por CoNS incluyen aquellos con dispositivos protésicos, marcapasos, catéteres intravasculares y receptores inmunocomprometidos.

Los estafilococos coagulasa negativos dan cuenta de aproximadamente un tercio de los aislados del torrente sanguíneo en las unidades de cuidados intensivos, lo que convierte a estos organismos en la causa más común de infección nosocomial en el torrente sanguíneo.

Las especies enterocócicas pueden provocar varias infecciones, que incluyen infecciones del tracto urinario, bacteriemia, endocarditis y meningitis. Los enterococos son relativamente resistentes a los efectos destructores de los agentes activos de la pared celular (penicilina, ampicilina y vancomicina) y son impermeables a los

aminoglucósidos.

Los enterococos resistentes a la vancomicina (VRE) son una causa cada vez más común y difícil de tratar de una infección adquirida en el hospital.

Se han descrito múltiples epidemias de infección por VRE en diversos entornos hospitalarios (por ejemplo, unidades de cuidados intensivos médicos y quirúrgicos y salas médicas y pediátricas) y, como el Staphylococcus aureus resistente a la meticilina, los VRE es endémico en muchos hospitales grandes.

Los factores que hacen a estas bacterias especialmente expertas para sobrevivir en diversos biomateriales incluyen la adherencia y la producción de biopelícula (véase a continuación).

Las tres bacterias mencionadas anteriormente tienen la capacidad de formar biopelículas sobre cualquier superficie biótica y abiótica. La etapa inicial de la formación de biopelículas es la unión/adherencia a la superficie, que es más fuerte en condiciones de tensión por cizalladura. La proteína responsable principalmente de esta adhesión es la adhesina intercelular polisacárida (PIA), que permite que las bacterias se unan entre sí, así como a las superficies, creando la biopelícula. La segunda etapa de la formación de biopelícula es el desarrollo de una estructura de comunidad y ecosistema, que da lugar a la biopelícula madura. La etapa final es el desprendimiento de la superficie con la consiguiente propagación a otros lugares. En todas las fases de la formación de biopelícula está implicado el sistema de detección de quórum (QS), comunicación mediada de célula a célula.

Las bacterias en la biopelícula producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que consisten principalmente en polisacáridos, ácidos nucleicos (ADN extracelular) y proteínas, que las protegen de amenazas externas, incluyendo los componentes del sistema inmune y los antimicrobianos. Además, las bacterias en la biopelícula tienen un metabolismo disminuido, lo que las hace menos susceptibles a los antibióticos; esto se debe al hecho de que la mayoría de los antimicrobianos requieren un cierto grado de actividad celular para ser efectivos. Otro factor que refuerza tal resistencia es el deterioro de la difusión de los antibióticos por toda la biopelícula debido a la presencia de la barrera de la matriz de EPS.

También se publicó que en la biopelícula hay una mayor tasa de intercambio de plásmidos, lo que aumenta las posibilidades de desarrollar resistencia de origen natural e inducida por los antimicrobianos.

Las estrategias que se han desarrollado para eliminar las biopelículas apuntan a 3 etapas diferentes en la formación de biopelícula: inhibición de la etapa inicial, es decir, la adhesión de bacterias a las superficies; interrupción de la arquitectura de biopelícula durante el proceso de maduración o etapa 2; inhibición del sistema QS o etapa 3.

Debido a la alta resistencia de estas biopelículas a los antibióticos, existe una creciente necesidad de control y prevención del crecimiento microbiano y la formación de biopelícula en la etapa 2. El tratamiento en caso de un dispositivo médico infectado es un tratamiento conservador o la retirada del dispositivo junto con un tratamiento prolongado con antibióticos, pero estos enfoques tienen altas tasas de fracaso y una carga económica elevada.

Esta es la razón por la que los médicos intentan adoptar un enfoque preventivo al suministrar antibióticos antes de la implantación. Otra solución podría ser la modificación de los dispositivos médicos, por ejemplo, superficies revestidas con plata, que tiene propiedades antimicrobianas o con hidrogeles así como poliuretanos, que reducen la adhesión bacteriana, por mencionar algunos ejemplos.

Según Eggiman en American Society for Microbiology Press, Washington, DC 2000. p.247, los marcapasos y los cardioversores-desfibriladores implantables (ICDs, por sus siglas en inglés) se pueden infectar, con una tasa de infecciones que varía de 0.8 a 5.7 por ciento.

La infección puede implicar a la bolsa subcutánea que contiene el dispositivo o al segmento subcutáneo de los cables. También puede ocurrir una infección más profunda que implica la porción transvenosa de los cables, usualmente con bacteriemia asociada y/o infección endovascular.

El dispositivo y/o la bolsa en sí mismos pueden ser la fuente de infección, usualmente debido a la contaminación en el momento de la implantación, o puede ser secundaria a una bacteriemia de una fuente diferente.

La contaminación perioperatoria de la bolsa del marcapasos con la flora de la piel parece ser la fuente más común de infección subcutánea.

La endocarditis infecciosa relacionada con un dispositivo cardíaco (CDRIE, por sus siglas en inglés) es otra afección potencialmente mortal, con una incidencia creciente debido al creciente número de implantes (81000 implantes de marcapasos por año en Europa). La incidencia de CDRIE alcanza el 0,14 por ciento, y es incluso mayor después del implante del ICD.

Staphylococcus aureus y los estafilococos coagulasa negativos (a menudo Staphylococcus epidermidis) causan del 65 al 75 por ciento de las infecciones de la bolsa del generador y hasta 89 por ciento de endocarditis relacionada con el dispositivo. Los episodios que surgen dentro de las dos semanas después de la implantación es más probable que sean debidos S. aureus.

El tratamiento exitoso de un dispositivo médico o biomaterial infectado, independientemente del componente implicado, generalmente requiere la retirada de todo el sistema y la administración de antibióticos dirigidos a las bacterias causantes. De manera importante, la terapia médica sola está asociada a una alta mortalidad y riesgo de recurrencia.

La endocarditis de válvula protésica (PVE) es una infección grave con consecuencias potencialmente fatales.

Las bacterias pueden llegar a la prótesis valvular por contaminación directa intraoperatoria o vía diseminación hematógena durante los días iniciales y semanas después de la cirugía. Las bacterias tienen acceso directo a la interfase prótesis-anillo y al tejido perivalvular a lo largo de las vías de sutura, debido a que el anillo de costura de la válvula, el anillo cardíaco y las suturas de anclaje no se endotelizan pronto después de la implantación de la válvula. Estas estructuras están revestidas con proteínas del receptor, tales como fibronectina y fibrinógeno, a las que algunos organismos se pueden adherir e iniciar la infección.

El riesgo de desarrollar endocarditis valvular protésica (PVE) es el mayor durante los tres meses iniciales después de la cirugía, sigue siendo alto hasta el sexto mes y a continuación disminuye gradualmente con una tasa anual de aproximadamente 0,4 por ciento desde los 12 meses posteriores a la operación en adelante. El porcentaje de pacientes que desarrollan PVE durante el año inicial después del reemplazo de la válvula varía de 1 a 3 por ciento en estudios con seguimiento activo; a los cinco años, el porcentaje acumulado varía de 3 a 6 por ciento.

Los patógenos encontrados con mayor frecuencia en la EPV temprana (dentro de los dos meses posteriores a la implantación) son S. aureus seguido de estafilococos coagulasa negativos.

Los patógenos más frecuentemente encontrados en la EPV temprana (dos meses después de la implantación de la válvula) son los estreptococos y S. aureus, seguidos de los estafilococos coagulasa negativos y los enterococos.

Los estafilococos coagulasa negativos que causan EPV durante el año inicial después de la cirugía son casi exclusivamente Staphylococcus epidermidis. Entre el 84 y el 87 por ciento de estos organismos son resistentes a la meticilina y, de este modo, resistentes a todos los antibióticos beta-lactámicos.

Según la encuesta francesa de 2008, la PVE representa alrededor del 20 por ciento de todas las endocarditis infecciosas. La PVE está relacionada con la atención médica en alrededor del 30 por ciento de los casos. S. aureus es el primer agente patógeno causante, siendo responsable de más del 20 por ciento de la PVE. Es importante destacar que, cuando se comparan datos de 1999, la mortalidad relacionada con la EVP sigue siendo alta, llegando a alrededor del 40 por ciento después de la cirugía y del 25 por ciento de mortalidad hospitalaria.

La infección de la articulación periprotésica (PJI, por sus siglas en inglés) ocurre en 1 a 2 por ciento de las cirugías de reemplazo de articulación y es la causa principal del fallo de la artroplastia.

Las biopelículas desempeñan un papel importante en la patogénesis de las PJIs. Las bacterias dentro de la biopelícula se vuelven resistentes a la terapia; como resultado, la terapia antibacteriana a menudo no tiene éxito a menos que la biopelícula se rompa físicamente o retire por desbridamiento quirúrgico.

Las infecciones de articulación protésica se clasifican según el momento de aparición de los síntomas después de la implantación: aparición temprana (<3 meses después de la cirugía), aparición retrasada (de 3 a 12 meses después de la cirugía) y aparición tardía (> 12 meses después de la cirugía). Estas infecciones tienen las siguientes características. Las infecciones de aparición temprana generalmente se adquieren durante la implantación y se deben a organismos virulentos, como Staphylococcus aureus, o infecciones mixtas. Las infecciones de aparición retrasada también se suelen adquirir durante la implantación. De acuerdo con la presentación indolente, las infecciones retrasadas suelen ser causadas por bacterias menos virulentas, tales como los estafilococos coagulasa negativos o enterococos. Las infecciones de aparición tardía resultantes de la siembra hematógena son típicamente agudas y, a menudo, se deben a S. aureus o estreptococos hemolíticos beta.

El tratamiento de las PJIs generalmente consiste tanto en cirugía como terapia antibacteriana.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente en la técnica de una nueva terapia antibacteriana.

El documento WO2009/034386 describe triazolopirimidinas que son útiles en el tratamiento de infecciones bacterianas gram-positivas, particularmente infecciones de E. faecalis o E. faecium pero estos compuestos son diferentes porque el átomo de nitrógeno del triazol no se puede sustituir por un grupo cicloalquilo. Además no se informa de ejemplo de inhibición para derivados de triazolo sino solo para derivados de purina.

Hemos encontrado sorprendentemente que los derivados de triazolo(4,5-d)pirimidina poseen actividad antibacteriana y se pueden usar en el tratamiento o prevención de la infección bacteriana en un mamífero receptor.

También hemos encontrado que dichos derivados de triazolo(4,5-d)pirimidina también se pueden usar en un método para controlar el crecimiento bacteriano en la formación de biopelícula en una etapa temprana tal como la etapa 1 o 2 o para matar bacterias en todas las etapas de la formación de biopelícula incluyendo la última etapa 3 en la que la biopelícula ha alcanzado su etapa de maduración de formación de la matriz y comienza el desprendimiento de la

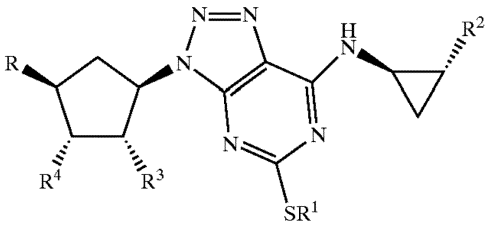
superficie con la consiguiente propagación de bacterias a otras localizaciones.

En un primer aspecto, la invención proporciona, por lo tanto, derivados de triazolo(4,5-d)pirimidina para uso en el tratamiento o prevención de la infección bacteriana en un mamífero receptor que necesita tal tratamiento.

Por infección bacteriana se entiende, por ejemplo, neumonía, septicemia, endocarditis, osteomielitis, meningitis, infecciones del tracto urinario, piel y de tejidos blandos. La fuente de infección bacteriana es diversa, y puede estar causada, por ejemplo, por el uso de biomateriales implantables.

Por biomateriales se entiende todo material extraño implantable para uso clínico en mamíferos receptores, tal como articulaciones protésicas, marcapasos, cardioversores-desfibriladores implantables, catéteres intravasculares, stent coronario, válvulas cardíacas protésicas, lentes intraoculares, implantes dentales y similares.

Por derivados de triazolo(4,5-d)pirimidina se entiende los compuestos de la siguiente fórmula (I)



(I)

en la que R^1 es alquilo de C_{3-5} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno; R^2 es un grupo fenilo, opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno; R^3 y R^4 son ambos hidroxilo; R es OH o XOH, en la que X es CH_2, OCH_2CH_2, o un enlace;

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo o un solvato de tal sal, con tal de que cuando X es CH_2 o un enlace, R^1 no es propilo; cuando X es CH_2 y R^1 $CH_2CH_2CF_3$, butilo o pentilo, el grupo fenilo en R^2 debe estar sustituido con flúor; cuando X es OCH_2CH_2 y R^1 es propilo, el grupo fenilo en R^2 debe estar sustituido con flúor.

Los grupos alquilo, ya sean solos o como parte de otro grupo, son de cadena lineal y están completamente saturados.

R^1 es un alquilo de C_{3-5} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de flúor. Preferentemente R^1 es 3,3,3-trifluoropropilo, butilo o propilo.

R^2 es fenilo o fenilo sustituido con uno o más átomos de halógeno. Preferentemente, R^2 es fenilo sustituido con átomos de flúor. Lo más preferentemente R^2 es 4-fluorofenilo o 3,4-difluorofenilo.

R es XOH, en la que X es CH_2, OCH_2CH_2, o un enlace; preferentemente R es OH u OCH_2CH_2OH.

Los derivados de triazolo(4,5-d)pirimidina más preferidos son los que incluyen R^2 como 4-fluorofenilo o 3,4-difluorofenilo y o R como OCH_2CH_2OH.

Los derivados de triazolo(4,5-d)pirimidina son compuestos bien conocidos. Se pueden obtener según el método descrito en el documento US 6,525,060.

Los derivados de triazolo(4,5-d)pirimidina se usan como medicamento contra la adhesión y agregación de plaquetas que son etapas preliminares en la trombosis arterial.

Funcionan antagonizando el receptor de plaquetas P2Y12 para ADP de una manera reversible, proporcionando la aparición rápida de efectos antiplaquetas después de la administración oral. El P2Y12 es uno de los dos receptores de ADP expresados por las plaquetas, que actúan amplificando las respuestas de las plaquetas a otros agonistas, lo que estabiliza los agregados de plaquetas y promueve la trombosis. Como consecuencia, los inhibidores de P2Y12, solos o en combinación con la aspirina, mejoran significativamente los resultados de los pacientes con síndromes coronarios agudos (ACS).

Ahora hemos encontrado sorprendentemente que tales derivados de triazolo(4,5-d)pirimidina también tienen un efecto antibacteriano.

Los derivados de triazolo(4,5-d)pirimidina preferidos son derivados con R igual a OH u OCH_2CH_2OH y/o R^2 es igual a 4-fluorofenilo o 3,4 difluorofenilo.

Los derivados de triazolo(4,5-d)pirimidina más preferidos son (1R-(1α,2α,3β(1R*,2*),5β))-3-(7-((2-(3,4-

difluorofenilo)ciclopropil)amino)-5-((3,3,3-trifluoropropil)tio)-3H-1,2,3-triazolo(4,5d)pirimidin-3-il)-5-(hidroxi)ciclopentano-1,2-diol;

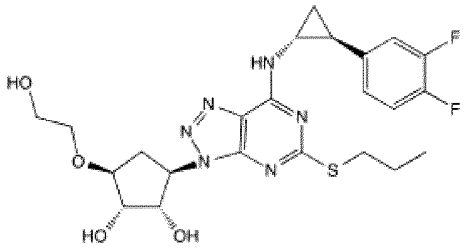
(1S-(1α,2α,3β(1R*,2*),5β))-3-(7-((2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil)amino)-5-(propiltio)(3H-1,2,3-triazolo(4,5d)pirimidin-3-il)-5-(2-hidroxietoxi)ciclopentano-1,2-diol;

(1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-difluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol);

(1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(4-fluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol);

y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo o un solvato de tal sal.

El derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina más preferido es (1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-difluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol) como se define en la fórmula (II) y también llamado Triafluocyl de aquí en adelante.



(II)

y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo o un solvato de tal sal.

Según la invención, el derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina se tiene que administrar al paciente durante varios días (especialmente en caso de prevención). El derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina se puede administrar por sí solo o en forma de una composición farmacéutica, con dosis no tóxicas que son inferiores a 1,8 g por día.

Un objetivo preferido adicional de la invención es una composición farmacéutica de derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina para uso en la prevención o tratamiento de infección bacteriana.

La composición farmacéutica puede ser un polvo seco o una composición líquida que tiene compatibilidad fisiológica. Las composiciones incluyen, además del derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina, sustancias auxiliares, conservantes, disolventes y/o agentes moduladores de la viscosidad.

El derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina de la presente invención muestra sus efectos por medio de la administración oral, intravenosa, intravascular, intramuscular, parenteral o tópica, y se puede usar adicionalmente en una composición para administración parenteral, particularmente una composición para inyección o en una composición para administración tópica. También se puede cargar en nanopartículas para aplicaciones de nanomedicina. Se puede usar en una composición de aerosol. Tal composición de aerosol es, por ejemplo, una disolución, una suspensión, una mezcla de polvo micronizado y similares. La composición se administra usando un nebulizador, un inhalador de dosis medida o un inhalador de polvo seco o cualquier dispositivo diseñado para tal administración.

Los ejemplos de composiciones galénicas incluyen comprimidos, cápsulas, polvos, píldoras, jarabes, chicles, gránulos y similares. Estas se pueden producir por medio de una técnica bien conocida y con el uso de aditivos típicos, como excipientes, lubricantes y aglomerantes.

Las sustancias auxiliares y las composiciones farmacéuticas apropiadas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, 1980, Mack Publishing Co., editada por Oslo et al. Típicamente, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la composición para hacer que la composición sea isotónica. Los ejemplos de sustancias farmacéuticamente aceptables incluyen disolución salina, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. El pH de la disolución es preferentemente de alrededor de 5 a alrededor de 8, y más preferentemente de alrededor de 7 a alrededor de 7.5.

Un objetivo aún más preferido de la invención es el derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina de fórmula (I) para uso en un método de tratamiento o prevención de la infección bacteriana en un mamífero receptor que necesite tal tratamiento, que comprende administrar al receptor una cantidad efectiva de derivados de triazolo(4,5-d)pirimidina como se define en la fórmula (I), preferentemente (1R-(1α,2α,3β(1R*,2*),5β))-3-(7-((2-(3,4-

difluorofenil)ciclopropil)amino)-5-((3,3,3-trifluoropropil)tio)-3H-1,2,3-triazolo(4,5d)pirimidin-3-il)5(hidroxi)ciclopentano-1,2-diol;

(1S-(1α,2α,3β(1R*,2*),5β))-3-(7-((2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil)amino)-5-(propiltio)(3H-1,2,3-triazolo(4,5d)pirimidin-3-il)-5-(2-hidroxietoxi)ciclopentano-1,2-diol;

(1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-difluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol);

y lo más preferentemente (1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(4-fluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol) como se define en la fórmula II;

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, o un solvato de los mismos o un solvato de tal sal.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de derivados de triazolo(4,5-d)pirimidina, preferentemente (1R-(1α,2α,3β(1R*,2*),5β))-3-(7-((2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil)amino)-5-((3,3,3-trifluoropropil)tio)-3H-1,2,3-triazolo(4,5d)pirimidin-3-il)-5-(hidroxi)ciclopentano-1,2-diol;

(1S-(1α,2α,3β(1R*,2*),5β))-3-(7-((2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil)amino)-5-(propiltio)(3H-1,2,3-triazolo(4,5d)pirimidin-3-il) 5 (2-hidroxietoxi)ciclopentano-1,2-diol;

(1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-difluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol);

(1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(4-fluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol);

y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos, o un solvato de los mismos o un solvato de tal sal;

y lo más preferentemente (1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-difluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo o un solvato del mismo o un solvato de tal sal;

como inhibidor de la biopelícula en una superficie, particularmente una superficie de un biomaterial o de un dispositivo médico.

Por superficie se entiende cualquier tipo de superficie, tal como superficie de plástico como, por ejemplo, una superficie hecha de polietileno, polipropileno, poliuretano, silicona o similares, pero también y preferentemente una superficie metálica tal como acero inoxidable, plata, oro, titanio, aleaciones metálicas, carbono pirolítico, y similares. También se puede usar en superficie de biomaterial tal como prótesis biológicas o dispositivos que están hechos de material biológico tal como, por ejemplo, pericardio porcino o bovino.

Por inhibición de la biopelícula en una superficie, se entiende la inhibición de la formación de la biopelícula en todas las etapas de su formación comenzando por una prevención o inhibición de la adherencia de bacterias en la superficie en la etapa 1, pero también y principalmente una inhibición del crecimiento, multiplicación y formación de microcolonias en la superficie en la etapa 2. Por inhibición de la biopelícula, también se entiende la inhibición de la matriz en la etapa 3 de maduración y la inhibición de la dispersión de bacterias de la matriz en una etapa de colonización. Por inhibición de la biopelícula, también se entiende matar las bacterias en todas las etapas de la formación de la biopelícula.

Por dispositivo médico se entiende un biomaterial como se define anteriormente, pero también un dispositivo médico que requiere un bajo nivel de contaminación bacteriana, tal como apósitos para heridas, rellenos de tejidos blandos, rellenos de conductos radiculares, lentes de contacto, bolsas de sangre y similares.

Un último aspecto adicional según la invención, es un método para matar o controlar el crecimiento bacteriano en la formación de biopelículas en una superficie que comprende aplicar el derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina en una superficie, ya sea en una etapa de prevención, reduciendo la adherencia de las bacterias sobre el sustrato o en una etapa en la que ya está presente la biopelícula, o incluso en una etapa de maduración con una formación de matriz en la que se establece una arquitectura más compleja de biopelicula que protege las bacterias como una barrera para el agente antibacteriano convencional.

El método para matar o controlar el crecimiento de bacterias en una superficie generalmente se aplica a biomateriales o dispositivos médicos.

El biomaterial o el dispositivo médico son preferentemente materiales extraños implantables para uso clínico en mamíferos receptores, tales como prótesis, marcapasos, cardioversores-desfibriladores implantables, catéteres intravasculares, stent coronario, válvulas cardíacas, lentes intraoculares y similares, pero se podría extender a otros dispositivos médicos que requieren un bajo nivel de contaminación bacteriana tales como, por ejemplo, apósitos para heridas, rellenos de tejidos blandos que contienen anestésicos locales, rellenos de conductos radiculares con

sustancias medicinales complementarias y similares.

El método para matar o controlar el crecimiento bacteriano también se podría aplicar a la superficie del dispositivo experimental que necesite tal tratamiento antibacteriano.

Descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra un efecto bacteriostático y bactericida de Triafluocyl en Staphylococcus aureus. Se muestran las curvas de crecimiento (A) y los recuentos viables (B) en presencia de diferentes concentraciones de Triafluocyl o DMSO como vehículo.

La Figura 2 ilustra una inhibición de la formación de biopelícula de Staphylococcus aureus por Triafluocyl en la etapa 2.

La Figura 3 ilustra un efecto bacteriostático y bactericida de Triafluocyl en Enterococcus faecalis. Se muestran las curvas de crecimiento (A) y el recuento viable (B) en presencia de diferentes concentraciones de Triafluocyl o DMSO como vehículo.

La Figura 4 ilustra una inhibición de la formación de biopelícula de Staphylococcus aureus por Triafluocyl en la etapa 2.

La Figura 5 ilustra un efecto bacteriostático y bactericida de Triafluocyl sobre Staphylococcus epidermidis. Curva de crecimiento (panel superior) y recuento viable (panel inferior) en presencia de diferentes concentraciones de Triafluocyl o DMSO como vehículo.

La Figura 6 ilustra una inhibición de la formación de biopelícula de Staphylococcus epidermidis en la etapa 2 por Triafluocyl: efecto de una incubación de 24 h con Triafluocyl.

La Figura 7 ilustra una destrucción de biopelícula madura (etapa 3: biopelícula de 24 horas) por Triafluocyl. Recuento viable de biopelícula de S. epidermidis después de un tratamiento de 24 horas con Triafluocyl (panel superior). Porcentaje de células vivas en la biopelícula (panel inferior).

Ejemplos:

La invención se ilustra de aquí en adelante mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Hemos realizado experimentos in vitro, usando S. aureus, S. epidermidis y E. faecalis como cepas bacterianas grampositivas clínicamente relevantes.

Los ensayos se realizaron según las recomendaciones del Comité Europeo de Ensayos de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST, del inglés European Committeee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Ejemplo 1: uso de (1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-difluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol) o Triafluocyl (Cayman, artículo No. 15425).

S. aureus (ATCC 25904) se cultivó durante la noche en medio Tryptic Soy Broth (TSB), se diluyó 1:100 en TSB de nueva aportación y se incubó aeróbicamente a 37ºC hasta que el crecimiento de las bacterias llegó a una fase logarítmica (OD_{600} = 0,25-0,3).

A continuación se añadieron concentraciones crecientes de Triafluocyl (Cayman Chemical, artículo No. 15425) o vehículo (DMSO) en 5 ml de suspensiones de bacterias. El crecimiento bacteriano se midió después de diferentes intervalos de tiempo (20-100 min) mediante espectrofotometría (OD_{600}) y contando las unidades que forman la colonia después de depositar las diluciones de cultivo apropiadas en placas de agar TS.

Los efectos bacteriostáticos y bactericidas se midieron con Triafluocyl. En la figura 1, se midió la cinética del crecimiento de S. aureus en presencia de concentraciones crecientes (de 1 µg/ml a 20 µg/ml) de Triafluocyl mediante la medida de la turbidez (gráfico superior) y el recuento viable (gráfico inferior). Los datos representan medianas ± rango (n = 3). * p <0,05; ** p <0,01, *** p <0,001, Triafluocyl vs vehículo.

Como se muestra en la Figura 1, mientras que una concentración de 10 µg/ml de Triafluocyl era capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, 20 µg/ml de Triafluocyl mostró un potente efecto bactericida.

Ejemplo 2: uso de (1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-difluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol) o Triafluocyl como inhibidor de la formación de biopelícula.

S. aureus (ATCC 25904) se dejó crecer durante la noche en medio TSB, antes de ser diluido 100 veces en TSB de nueva aportación, y se incubó aeróbicamente a 37ºC hasta que el cultivo de bacterias llegó a una OD_{600} de 0.6 (que corresponde a aproximadamente 1-3 x 10^8 CFU/ml). Los cultivos de bacterias se diluyeron a continuación a 1 x 10^4 CFU/ml en TSB de nueva aportación. Se distribuyeron alícuotas de 800 µl de suspensiones de bacterias diluidas en

cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Las bacterias se dejaron adherir durante 4 horas en condiciones estáticas a 37ºC. Después de retirar los medios, los pocillos se lavaron 2 veces con PBS para retirar las bacterias planctónicas y se volvieron a llenar con TSB suplementado con glucosa al 0,5%.

A continuación se añadió Triafluocyl o DMSO como vehículo a la concentración deseada y las placas se incubaron a 37ºC durante 20 horas. Después de la incubación, los pocillos se lavaron y se tiñeron con violeta cristal al 0,5% (p/v) durante 30 minutos, se lavaron de nuevo y el tinte se solubilizó mediante la adición de ácido acético al 20% (v/v en agua) antes de leer la absorbancia a 595 nm.

Se formaron biopelículas de S. aureus en una superficie de poliestireno en presencia de concentraciones crecientes de Triafluocyl o DMSO como vehículo. En la figura 2, la masa de biopelícula se presenta como porcentaje de valores obtenidos en presencia de DMSO (* P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001, Triafluocyl versus DMSO, n = 4).

El Triafluocyl reduce significativamente la formación de biopelículas de S. aureus en todas las concentraciones ensayadas. En la presencia de 10 µg/ml de Triafluocyl, no se podía formar biopelícula en la superficie de poliestireno.

Ejemplo 3: uso de (1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-difluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol) o Triafluocyl (Cayman Chemical, número de artículo 15425).

E. faecalis (ATCC 29212) se dejó crecer durante la noche en medio de infusión cerebro corazón (BHI, del inglés Brain Heart Infusion), se diluyó 1:100 en BHI de nueva aportación y se incubó aeróbicamente a 37ºC hasta que el crecimiento de las bacterias llegó a una fase logarítmica (OD_{600} = 0,25-0,3).

A continuación se añadieron concentraciones crecientes de Triafluocyl (Cayman Chemical, artículo No. 15425) o DMSO como vehículo en 5 ml de suspensiones de bacterias. El crecimiento bacteriano se midió después de diferentes intervalos de tiempo (30-120 min) por espectrofotometría (OD_{600}) y contando las unidades que forman la colonia después de depositar diluciones de cultivo apropiadas en placas de agar BHI.

Se midieron los efectos bacteriostáticos y bactericidas con Triafluocyl. En la Figura 3 se midió la cinética del crecimiento de E. faecalis en presencia de concentraciones crecientes (de 5 µg/ml a 40 µg/ml) de Triafluocyl mediante la medida de la turbidez (gráfico superior) y recuento viable (gráfico inferior). Los datos representan medianas ± rango (n = 3).

Como se muestra en la Figura 3, mientras que una concentración de 10 µg/ml de Triafluocyl era capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, 20 µg/ml de Triafluocyl y, lo que es más importante, 40 µg/ml mostraron potentes efectos bactericidas.

Ejemplo 4: uso de Triafluocyl como inhibidor de la formación de biopelícula.

E. faecalis (ATCC 29212) se dejó crecer durante la noche en medio BHI, antes de ser diluida 100 veces en TSB de nueva aportación y se incubó aeróbicamente a 37ºC hasta que el cultivo de bacterias llegó a una DO_{600} de 0.6 (que corresponde a aproximadamente 2-5 x 10^8 CFU/ml). Los cultivos de bacterias se diluyeron a continuación a 1 x10^4 CFU/ml en TSB de nueva aportación. Se distribuyeron alícuotas de 800 µl de suspensiones de bacterias diluidas en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Las bacterias se dejaron adherir durante 4 horas en condiciones estáticas a 37ºC. Después de retirar los medios, los pocillos se lavaron 2 veces con PBS para retirar las bacterias planctónicas y se volvieron a llenar con TSB suplementado con glucosa al 0,5%.

A continuación se añadió Triafluocyl o DMSO como vehículo a la concentración deseada y las placas se incubaron a 37ºC durante 20 horas. Después de la incubación, los pocillos se lavaron y se tiñeron con violeta cristal al 0,5% (p/v) durante 30 minutos, se lavaron nuevamente y el tinte se solubilizó mediante la adición de ácido acético al 20% (v/v en agua) antes de leer la absorbancia a 595 nm.

Se formaron biopelículas de E. faecalis en una superficie de poliestireno en presencia de concentraciones crecientes de Triafluocyl o DMSO como vehículo. En la figura 2, la masa de biopelícula se presenta como porcentaje de valores obtenidos en presencia de DMSO (* P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001, Triafluocyl versus DMSO, n = 4).

El Triafluocyl reduce significativamente la formación de biopelículas de E. faecalis en una concentración inicial de 10 µg/ml. En la presencia de 40 µg/ml de Triafluocyl, no se podía formar biopelícula en la superficie de poliestireno.

Ejemplo 5: efecto del Triafluocyl en S. epidermidis: ensayo de susceptibilidad: determinación de MIC y MBC

La concentración inhibitoria mínima (MIC) y la concentración bactericida mínima (MBC) de Fluometacyl se determinaron en Staphylococcus epidermidis (ATCC 35984, también conocida como RP62A) según las recomendaciones del EUCAST.

Brevemente, se resuspendió una sola colonia crecida en una placa de Tryptic Soy Agar (TSA) y se cultivó en Tryptic Soy Broth (TSB) durante la noche (O/N) en condiciones aeróbicas (37ºC con agitación a 220 rpm), al día siguiente

se incubó un inóculo 1:50 en caldo Mueller-Hinton (MHB) en condiciones aeróbicas durante 3 horas y un inóculo adicional de dilución 1:100 correspondiente a 3 x 10^5 UFC/ml, se incubó en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de Triafluocyl en DMSO al 1% (vehículo). Después del crecimiento O/N se midió la OD de cada cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro (OD_{600}). La MIC representa la concentración a la que no hay crecimiento visible de bacterias, es decir, ΔOD a 600nm es igual a cero (el blanco es el medio solo).

Hemos determinado también la MBC, es decir, la concentración a la que el cultivo líquido, cuando se deposita en placas de TSA, no producirá ninguna colonia.

La MIC para Trifluocyl contra S. epidermidis es igual a 12 ± 3 µg/ml y la MBC es 17 ± 3 µg/ml (dos réplicas biológicas, límite de detección 1 x 10^{-3}).

Ejemplo 6: estudio del tiempo para matar S. epidermidis in fase logarítmica.

Para evaluar el efecto antibacteriano del Triafluocyl hemos ensayado el crecimiento en líquido de S. epidermidis en presencia de diferentes concentraciones de Triafluocyl en fase logarítmica. En esta fase las bacterias usualmente son muy susceptibles a agentes con actividad bactericida porque se dividen rápidamente.

Un inóculo 1:100 en 50 ml de TBS de un cultivo O/N de S. epidermidis se cultivó durante 3 h hasta su fase logarítmica (OD_{600} = 0.26 y ≈ 3 x 10^8 CFU/ml).

Las bacterias se dividieron en varios tubos que contienen diferentes concentraciones de DMSO como único vehículo o en combinación con Triafluocyl en TSB y se cultivaron durante 100 min a 37ºC con agitación de 220 rpm, la OD_{600} se midió cada 20 minutos.

Comparado con el crecimiento con DMS (0,25%) observamos una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento de S. epidermidis entre 10 µg/ml y 20 µg/ml de Triafluocyl (Figura 5). A 50 µg/ml observamos una ligera actividad bacteriostática, confirmada por el número de células viables a los 80 min, 3 x 10^8 CFU/ml, igual al número de bacterias en el control no tratado al comienzo del ensayo (Figura 5).

Además, hemos ensayado el efecto del Triafluocyl en un inóculo de baja densidad, 0,08 x 10^6 CFU/ml, de un cultivo de S. epidermidis en fase logarítmica. Hemos seguido el crecimiento durante 4 h con o sin Triafluocyl y hemos medido la OD_{600}: ya 5 µg/ml de Triafluocyl disminuyó la OD en 50% comparado con el crecimiento en ausencia de Triafluocyl en el mismo punto; 10 µg/ml y 20 µg/ml inhibieron el crecimiento (valor de OD igual la OD al comienzo del crecimiento) (datos no mostrados).

Esto quiere decir que cuanto más baja sea la densidad del inóculo más baja será la concentración de Triafluocyl para ralentizar el crecimiento o matar las bacterias.

Ejemplo 7: el Triafluocyl afecta a la formación de biopelícula de S. epidermidis

Para estudiar el efecto del Triafluocyl en la formación de biopelícula, S. epidermidis en una incipiente fase logarítmica (5 x 10^8 CFU/ml) se depositaron en una placa de 24 pocillos y se dejaron adherir en el fondo del pocillo durante 4 horas a 37ºC condiciones estáticas. Después de 4 horas de incubación, se retiraron las bacterias planctónicas y las bacterias adherentes se lavaron dos veces en TSB. Se añadió medio TSB de nueva aportación suplementado o no con glucosa al 0,25% al pocillo con 5 concentraciones diferentes de Triafluocyl y se incubaron durante 24 horas. Los pocillos se lavaron 3 veces con NaCl al 0.9% y se incubaron durante 1 h a TA con disolución al 1% de violeta cristal en H_2O destilada para teñir la biopelícula.

Los pocillos se lavaron 3 veces con H_2O destilada para retirar el violeta cristal no unido, a continuación, se añadieron 400µl de ácido acético al 10% y se incubaron a TA durante 10 min. La absorbancia se midió por triplicado a 570 nm, reflejando la biomasa total de la biopelícula (bacterias vivas y muertas).

El Triafluocyl afectó a la formación de biopelícula (Figura 6): ya a 5 µg/ml, en ausencia de glucosa, inhibió la formación de biopelícula en un 50%, mientras que en presencia de glucosa llegamos a una reducción del 50% de biopelícula solo a 20 µg/ml de Triafluocyl.

La concentración de Triafluocyl que inhibe por lo menos el 90% de la formación de biopelícula se denomina concentración inhibitoria mínima de biopelícula (MBIC). La MIBIC del Triafluocyl para S. epidermidis es de 50 µg/ml tanto en presencia como en ausencia de glucosa.

Ejemplo 7: el Triafluocyl destruye biopelícula madura de S. epidermidis

En otro experimento, dejamos adherir 0,5 x 10^8 CFU/ml de células de S. epidermidis durante 4 horas y dejamos que la biopelícula se forme durante 24 horas adicionales en presencia de glucosa al 0,25%. En este punto, tratamos la biopelícula con varias concentraciones de Triafluocyl durante 24 horas en TSB con glucosa al 0,25% y determinamos el recuento viable (Figura 7), así como el porcentaje de células vivas usando el kit de viabilidad bacteriana BacLight (Molecular Probes).

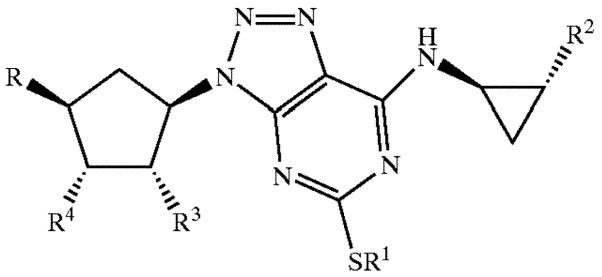
Para el análisis de biopelículas, primero lavamos la biopelícula para retirar todas las bacterias planctónicas y a continuación la biopelícula se desprendió mecánicamente usando un raspador. Para asegurar que los agregados de la biopelícula estaban completamente disociados, la suspensión de células se pasó a través de una aguja (0,5 x 16 mm) y se depositó una dilución en placas de TSA.

Solo la concentración más alta de Triafluocyl, 50 µg/ml, era efectiva para reducir el número de células viables en la biopelícula con una reducción de casi 3 log (de 1,1 x 10^8 CFU/ml en el control a 1,5 x 10^5 CFU/ml).

En el mismo experimento también determinamos el porcentaje de bacterias vivas y muertas. Para hacerlo seguimos el procedimiento del kit LIVE/DEAD de Molecular Probes. En resumen, la biopelícula se resuspendió en una disolución de NaCl al 0,9% y las células se tiñeron con una mezcla de SYT09 (fluorescencia verde) y yoduro de propidio (PI) (fluorescencia roja) durante 15 minutos en la oscuridad. Las células teñidas se transfirieron a una placa de 96 pocillos y la fluorescencia se midió usando el Espectrofotómetro Enspire con longitud de onda de excitación de 470 nm y espectros de emisión en el intervalo de 490-700 nm. El colorante SYT09 (fluorescencia verde 500-520 nm) penetra en todas las células (muertas y vivas) y se une al ADN, mientras que el PI (fluorescencia roja en el intervalo de 610-630 nm) entra solo en células muertas con una membrana celular dañada. Cuando PI y SYT09 están en la misma celda, la intensidad de la fluorescencia verde disminuye. Por lo tanto, en una población de células con un alto porcentaje de células muertas, hay una reducción en los espectros de emisión de la fluorescencia verde, porque hay más tinción de PI. La relación de intensidad (verde/vivo) de fluorescencia se representa en función de un porcentaje conocido de células vivas para obtener una curva estándar y el porcentaje de células vivas en nuestras muestras se obtiene mediante extrapolación (Figura 7). El Triafluocyl, en concentraciones de 20 µg/ml y 50 µg/ml redujo el porcentaje de bacterias vivas al 80% y 30%, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina de fórmula (I)

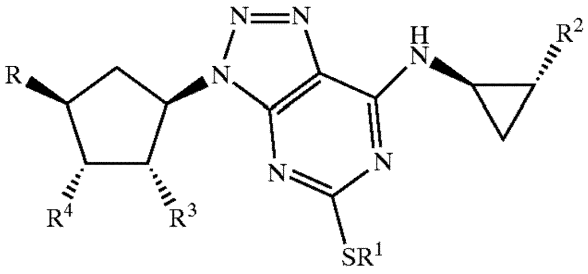


en la que R^1 es alquilo de C_{3-5} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno; R^2 es un grupo fenilo, opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno; R^3 y R^4 son ambos hidroxilo; R es XOH, en la que X es CH_2, OCH_2CH_2, o un enlace;

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato de tal sal, con tal de que cuando X es CH_2 o un enlace, R^1 no es propilo; cuando X es CH_2 y R^1 $CH_2CH_2CF_3$, butilo o pentilo, el grupo fenilo en R^2 debe estar sustituido con flúor; cuando X es OCH_2CH_2 y R^1 es propilo, el grupo fenilo en R^2 debe estar sustituido con flúor;

para uso en el tratamiento o prevención de infección bacteriana en un mamífero receptor que necesite tal tratamiento.

2. El uso de un derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina de fórmula (I) como inhibidor de la formación de biopelícula gram-positiva sobre una superficie, en el que el uso no es un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia,



en la que R^1 es alquilo de C_{3-5} opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno; R^2 es un grupo fenilo, opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno; R^3 y R^4 son ambos hidroxilo; R es XOH, en la que X es CH_2, OCH_2CH_2, o un enlace;

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato de tal sal, con tal de que cuando X es CH_2 o un enlace, R^1 no es propilo; cuando X es CH_2 y R^1 $CH_2CH_2CF_3$, butilo o pentilo, el grupo fenilo en R^2 debe estar sustituido con flúor; cuando X es OCH_2CH_2 y R^1 es propilo, el grupo fenilo en R^2 debe estar sustituido con flúor;

3. El derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina para uso según la reivindicación 1, en el que R^2 es fenilo sustituido con átomos de flúor.

4. El derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en el que R es OH u OCH_2CH_2OH.

5. El derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina para uso según la reivindicación 4 seleccionado de:

(1R-(1α,2α,3β(1R*,2*),5β))-3-(7-((2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil)amino)-5-((3,3,3-trifluoropropil)tio)-3H-1,2,3-triazolo(4,5d)pirimidin-3-il)-5-(hidroxi)ciclopentano-1,2-diol;

(1S-(1α,2α,3β(1R*,2*),5β))-3-(7-((2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil)amino)-5-(propiltio)(3H-1,2,3-triazolo(4,5d)pirimidin-3-il)-5-(2-hidroxietoxi)ciclopentano-1,2-diol;

(1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-difluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol);

(1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(4-fluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-

(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol);

y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo o un solvato de tal sal.

6. El derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 5, que es (1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-difluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol) también denominado Triafluocyl.

7. El derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina de fórmula (I) para uso según la reivindicación 1 en un método para tratamiento de una infección bacteriana gram-positiva que comprende administrar al receptor, el derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina en una cantidad efectiva inferior a 1,8 g por día.

8. Triafluocyl para uso según la reivindicación 6, en un método para tratamiento de una infección bacteriana gram-positiva que comprende administrar al receptor el Triafluocyl en una cantidad inferior a 1,8 g por día.

9. El uso de un derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina de fórmula (I) como inhibidor de formación de biopelícula sobre una superficie según la reivindicación 2, en el que R^2 es fenilo sustituido con átomos de flúor.

10. El uso de un derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina de fórmula (I) como inhibidor de la formación de biopelícula sobre una superficie según la reivindicación 2 y 9, en el que R es OH u OCH_2CH_2OH.

11. El uso de un derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina de fórmula (I) como inhibidor de la formación de biopelícula según la reivindicación 10, en el que el derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina se selecciona de:

(1R-(1α,2α,3β(1R*,2*),5β))-3-(7-((2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil)amino)-5-((3,3,3-trifluoropropil)tio)-3H-1,2,3-triazolo(4,5d)pirimidin-3-il)-5-(hidroxi)ciclopentano-1,2-diol;

(1S-(1α,2α,3β(1R*,2*),5β))-3-(7-((2-(3,4-difluorofenil)ciclopropil)amino)-5-(propiltio)(3H-1,2,3-triazolo(4,5d)pirimidin-3-il)-5-(2-hidroxietoxi)ciclopentano-1,2-diol;

(1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-difluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol);

(1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(4-fluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol);

y una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo o un solvato de tal sal.

12. El uso de un derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina de fórmula (I) como inhibidor de la formación de biopelícula sobre una superficie según la reivindicación 10 o 11, en el que el derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina es (1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-difluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3]-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)-1,2-ciclopentanodiol) también denominado Triafluocyl.

13. Un método para matar o controlar el crecimiento bacteriano gram-positivo en la formación de biopelícula que comprende aplicar en la superficie una cantidad efectiva de derivado de triazolo(4,5-d)pirimidina de la fórmula (I) según la reivindicación 2.

14. El método para matar bacterias en la formación de biopelícula sobre una superficie según la reivindicación 13, en el que la formación de biopelícula es en una etapa 3 de maduración que comprende más de 90 x 10^6 CFU/cm^2.

15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 9 a 14, en el que la superficie pertenece a un biomaterial.

16. El método según la reivindicación 15, en el que el biomaterial es un dispositivo cardiovascular.

17. El método según la reivindicación 16, en el que el dispositivo cardiovascular es una válvula cardíaca protésica.

18. El método según la reivindicación 16, en el que el dispositivo cardiovascular es un marcapasos.

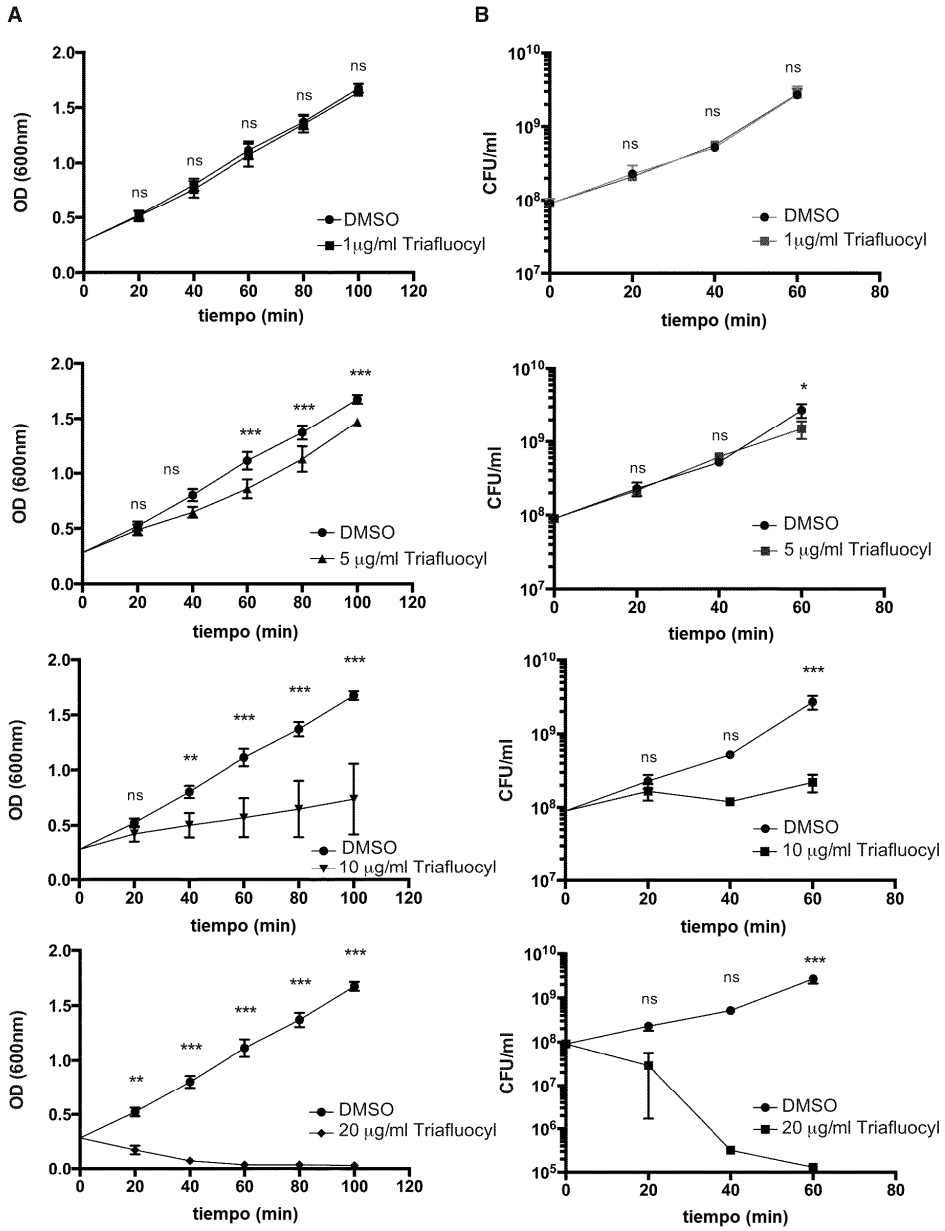

A
B
OD (600nm)
CFU/ml
tiempo (min)
DMSO
1 µg/ml Triafluocyl
5 µg/ml Triafluocyl
10 µg/ml Triafluocyl
20 µg/ml Triafluocyl
ns
*
**
***

Figura 1

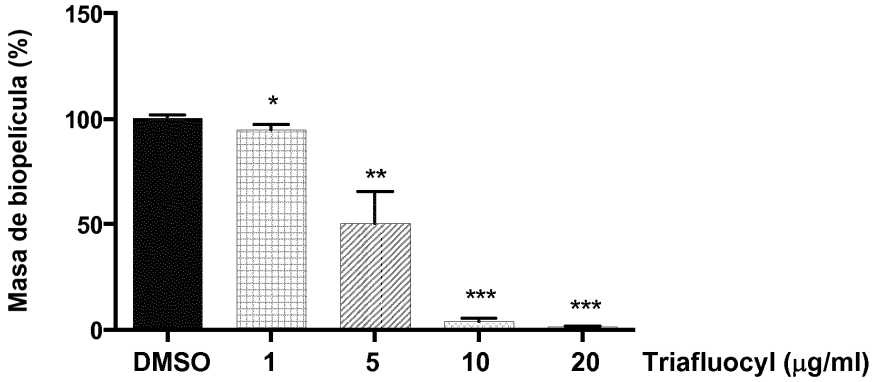

Masa de biopelícula (%)
150
100
50
0
*
**
***
***
DMSO
1
5
10
20
Triafluocyl (µg/ml)

Figura 2

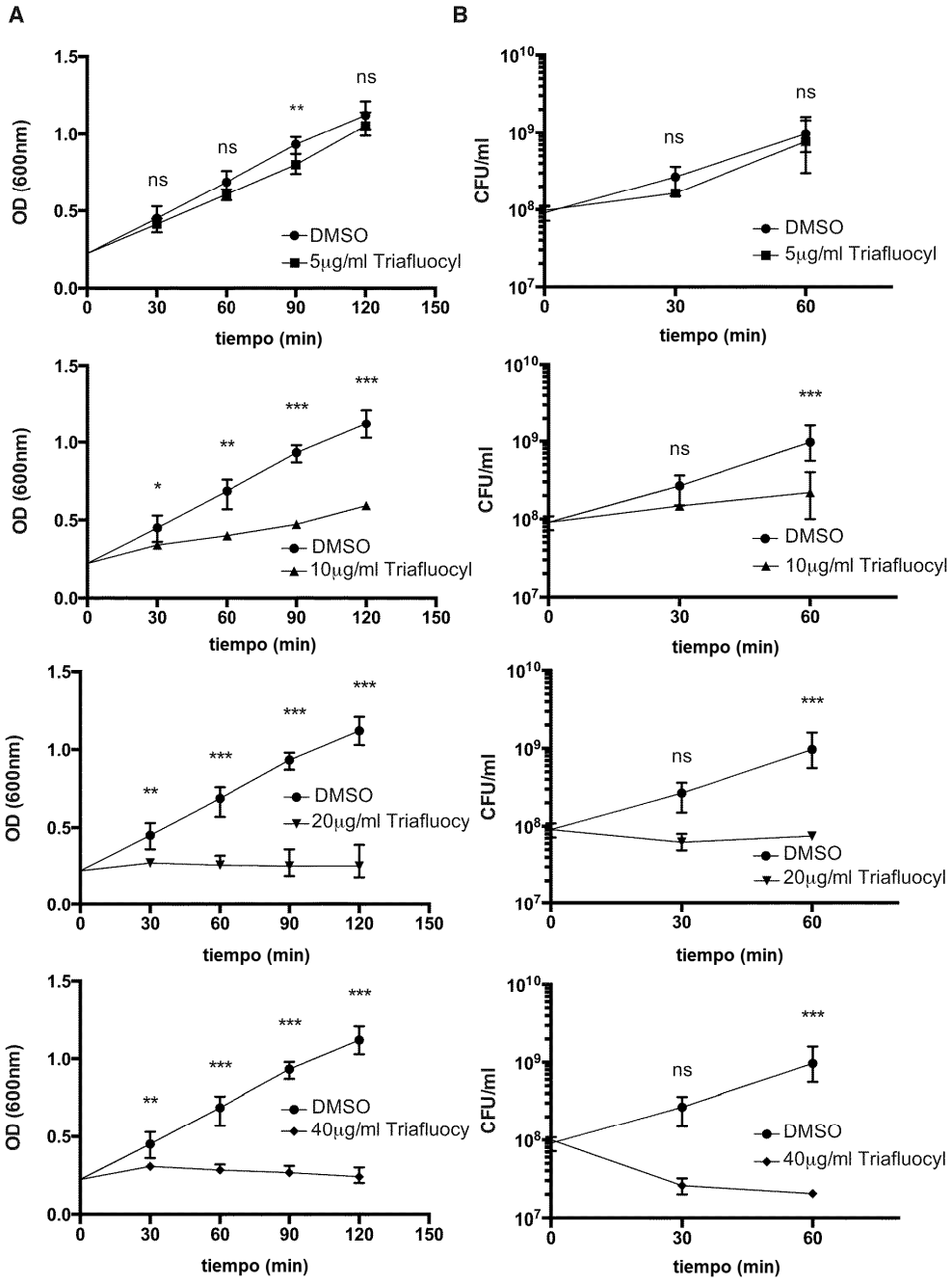

A
B
OD (600nm)
CFU/ml
tiempo (min)
DMSO
5µg/ml Triafluocyl
10µg/ml Triafluocyl
20µg/ml Triafluocy
40µg/ml Triafluocy
ns
*
**
***

Figura 3

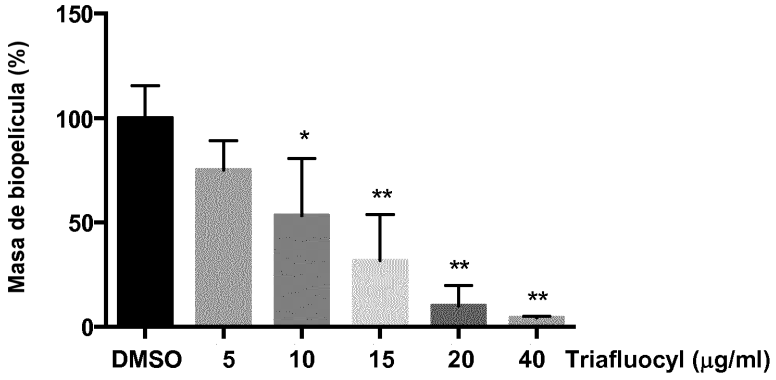

Masa de biopelícula (%)
150
100
50
0
*
**
**
**
DMSO
5
10
15
20
40
Triafluocyl (µg/ml)

Figura 4

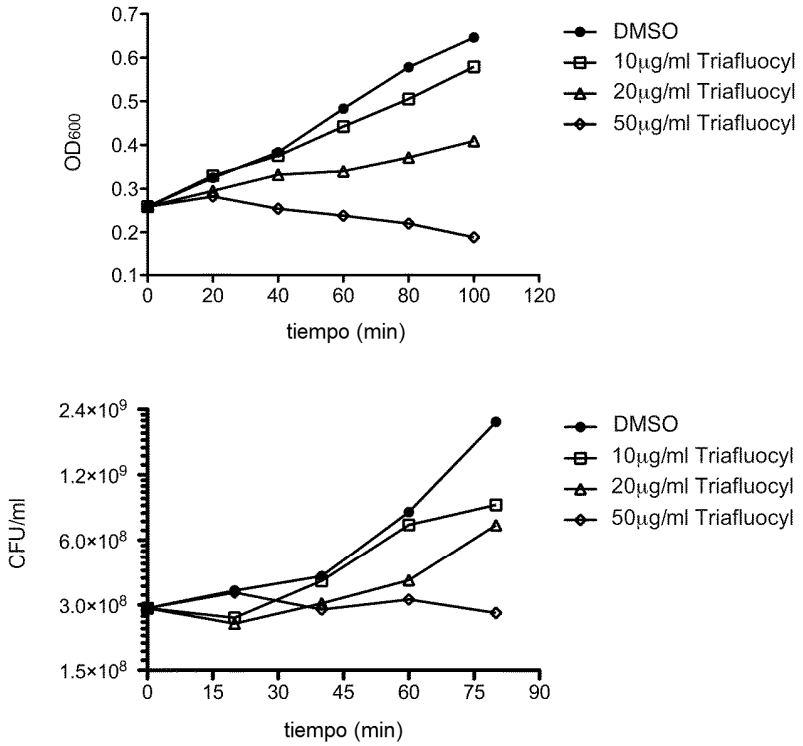

0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
OD600
0
20
40
60
80
100
120
tiempo (min)
DMSO
10µg/ml Triafluocyl
20µg/ml Triafluocyl
50µg/ml Triafluocyl
2.4×10^9
1.2×10^9
6.0×10^8
3.0×10^8
1.5×10^8
CFU/ml
0
15
30
45
60
75
90
tiempo (min)
DMSO
10µg/ml Triafluocyl
20µg/ml Triafluocyl
50µg/ml Triafluocyl

Figura 5

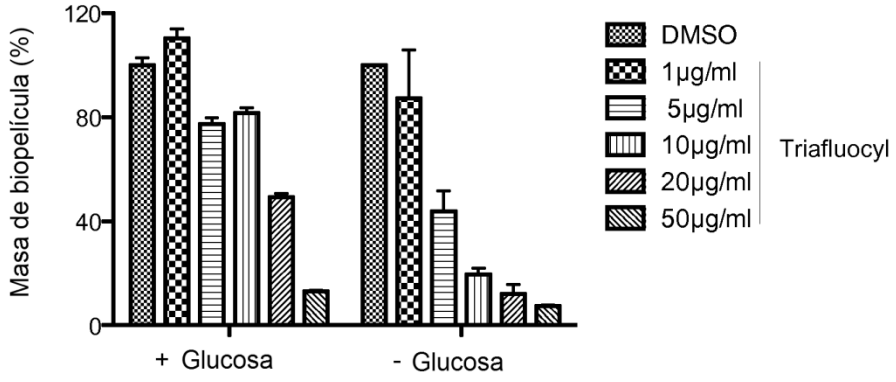

120
80
40
0
Masa de biopelícula (%)
+ Glucosa
- Glucosa
DMSO
1µg/ml
5µg/ml
10µg/ml
20µg/ml
50µg/ml
Triafluocyl

Figura 6

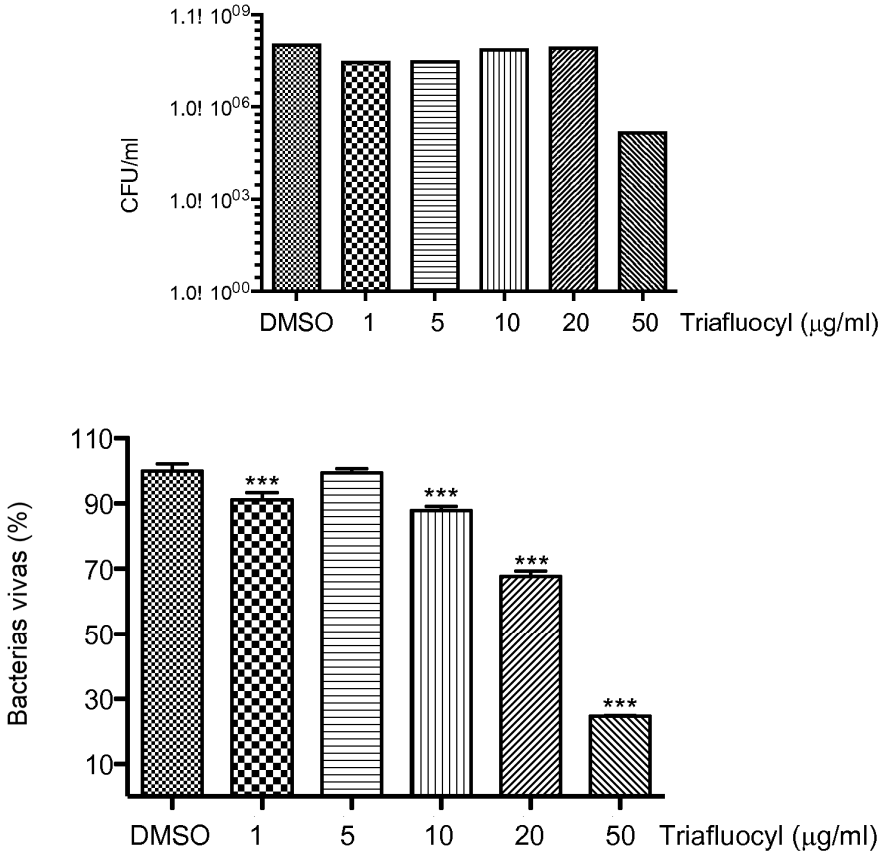

1.1! 10^09
1.0! 10^06
1.0! 10^03
1.0! 10^00
CFU/ml
DMSO 1 5 10 20 50 Triafluocyl (µg/ml)
110
90
70
50
30
10
Bacterias vivas (%)
***
***
***
***
DMSO 1 5 10 20 50 Triafluocyl (µg/ml)

Figura 7