

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 613**

51 Int. Cl.:
C07D 498/08 (2006.01)
A61K 31/553 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08169901 .9**
96 Fecha de presentación: **25.11.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2189462**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2010**

54 Título: **Inhibidores peptidomiméticos bicíclicos de aspartil-proteasas para el tratamiento de enfermedades infecciosas**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE
PIAZZA SAN MARCO, 4
50121 FIRENZE, IT**

72 Inventor/es:
**Cassone, Antonio;
De Bernardis, Flavia;
Garaci, Enrico;
Trabocchi, Andrea y
Guarna, Antonio**

74 Agente/Representante:
Ruo, Alessandro

ES 2 380 613 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores peptidomiméticos bicíclicos de aspartil-proteasas para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

5 **Campo de la invención**

10 [0001] La presente invención se refiere a derivados de 3-aza-biciclo[3,2,1]octano de fórmula general (I) útiles en el tratamiento enfermedades infecciosas y particularmente patologías producidas por patógenos microbianos que expresan la actividad aspartil-proteasa. Específicamente, la invención se refiere a compuestos de fórmula general (I) y sus metabolitos, como inhibidores de SAP2 de *Candida albicans* para el tratamiento de infecciones fúngicas, como inhibidores de proteasa del VIH para tratar infecciones por VIH, o como inhibidores de plasmepsinas o histo-aspartil proteasa (HAP) para el tratamiento de la malaria.

15 **Estado de la técnica**

20 [0002] Las aspartil proteasas están ampliamente distribuidas en muchos organismos y tejidos con diferentes propiedades fisiológicas y funcionales, y contienen dos restos de aspartilo en el sitio activo, uno protonado y el otro no, que actúan juntos como catalizadores ácido-base generales. Se cree que una molécula de agua unida entre dos restos de aspartato es el nucleófilo para la hidrólisis del enlace de amida, y se activa mediante el resto de ácido aspártico catalítico desprotonado. Para catalizar la hidrólisis del péptido, los dos restos aspárticos deben estar lo suficientemente próximos en la estructura terciaria de la molécula. La mayoría de las proteasas aspárticas pertenecen a la familia de la pepsina, incluyendo enzimas digestivas, tales como pepsina y quimotripsina, así como captasinas lisosomales D y enzimas procesadoras, tales como renina y ciertas proteasas fúngicas (los SAP de *Candida albicans*, penicilopepsina, etc). Una segunda familia comprende proteasas virales, tales como el VIH, también llamada retropepsina. En general, el sitio activo de las proteasas aspárticas no contiene grupos que sean lo suficientemente nucleófilos para que puedan modificarse químicamente por un inhibidor selectivo irreversible. Por lo tanto, la mayoría de los inhibidores de proteasa aspártica desarrollados hasta ahora se unen a su enzima diana a través de interacciones no covalentes. Por tanto, estos compuestos son inhibidores reversibles y dan como resultado una inhibición eficaz cuando la enzima muestra una afinidad mayor por el inhibidor que por su sustrato natural (Tacconelli, E. *et al.* Curr. Med. Chem. 2004, 4,49).

35 [0003] Se ha propuesto que estructuras estables que se parecen al estado de transición de una reacción catalizada por enzimas deben unir la enzima más estrechamente que el sustrato. En consecuencia, una estrategia que ha sido muy satisfactoria para el diseño de inhibidores de aspartil proteasa eficaces se basa en la incorporación de un isómero en estado de transición en una estructura peptidomimética.

40 [0004] *Candida albicans* es un patógeno fúngico oportunista que produce infecciones sistémicas graves especialmente en individuos inmunodeficientes. Aunque cierto número de agentes antifúngicos están disponibles, la necesidad de nuevos fármacos contra *C. albicans* está aumentando debido tanto a la extensa aparición de infecciones sistémicas y mucosas producidas por *Candida*, como al desarrollo de resistencia a los fármacos disponibles (Shao, P. -L. *et al.* Int. J. Antimicrob. Agents 2007, 30, 487). De hecho, a pesar de la disponibilidad de fármacos, *Candida albicans* destaca como una causa muy frecuente de morbilidad, coste de hospitalización y mortalidad (Pfaller MA & D:J:Diekema. Epidemiology of invasive Candidiasis: a persistent public health Problem. Clin. Microbiol. Rev. 2007;20:133-163). Aunque la capacidad de producir una enfermedad es probablemente un proceso complejo que implica interacciones múltiples entre *Candida* y el huésped, la actividad de las Aspartil Proteasas Secretadas (SAP) parece ser un factor de virulencia principal y por tanto ofrece una posible diana para la intervención del fármaco en infecciones. Las cepas de *Candida* expresan al menos nueve genes distintos (SAP1-9) en el transcurso de la misma enfermedad pero en diferentes etapas de infección, indicando que las diferentes SAP tienen funciones diferentes (Schaller, M. *et al.* J. Invest. Dermatol. 2000, 114, 712); particularmente, entre ellas, la SAP2 es una de las enzimas más expresadas, implicadas en la invasión y colonización persistente en el huésped.

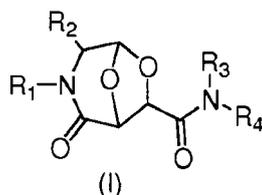
50 [0005] Otras pruebas consistentes de la necesidad de inhibidores de la actividad de la aspartil proteasa se deben a los siguientes aspectos:

- 55 - Los pacientes inmunodeficientes que padecen infecciones producidas por *Candida albicans* pueden desarrollar candidiasis sistémica y también resistencia a productos terapéuticos comunes.
- Los virus VIH y HTLV dependen de sus aspartil proteasas para la maduración vírica.
- 60 - *Plasmodium falciparum* utiliza las plasmepsinas I y II para procesar hemoglobina. Recientemente, se ha demostrado la actividad inhibitoria de inhibidores de proteasa del VIH (VIH-IP) frente a microorganismos patógenos en los que las aspartil proteasas desempeñan una función clave (Tacconelli *et al.*, Curr. Med. Chem., 2004,4,49). Particularmente, los VIH-IP muestran actividad micromolar hacia las aspartil proteasas de *Candida albicans* (Cassone *et al.*, J. Infect. Dis., 1999, 180, 448) y las plasmepsinas II y IV de la malaria (Andrews *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 2006, 639). Tales resultados armonizan con la flexibilidad de estas moléculas y alguna analogía estructural entre la aspartil proteasas del VIH-1 y la SAP2 de *Candida*

albicans.

[0006] Por lo tanto, nuevos compuestos que tengan actividad inhibidora hacia las aspartil proteasas pueden actuar como inhibidores de SAP2 de *Candida albicans* para tratar infecciones fúngicas, como inhibidores de la proteasa del VIH para tratar infecciones por VIH, como inhibidores de plasmepsinas o de histioaspartil proteasa (HAP) para tratar la malaria.

Los compuestos de fórmula (I)



en la que:

R1 se selecciona entre el grupo que consiste en H, bencilo, p-metoxibencilo, benzhidrilo; preferiblemente bencilo; R2 se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo, arilo, alquilarilo; preferiblemente H, bencilo, metilo, isobutilo. R3 y R4 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo, alquenoilo, alquinilo, cicloalquilo, alquilarilo, arilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, alcoxicarbonilo, -CH(cadena lateral de α -aminoácido)CH₂OH; preferiblemente H, hidroxietilo, propargilo, -CH(cadena lateral de Leu)CH₂OH; R3 y R4 junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un ciclo, eventualmente sustituido; preferiblemente piperidina, 4-hidroxietil-piperazina, 4-carboetoxi-piperazina, morfolina; incluyendo todas las combinaciones posibles de estereoisómeros; son conocidos.

[0007] Su preparación se ha indicado en J. Org. Chem. 1999, 64, 7347; J. Org. Chem. 2002, 67, 7483; Bioorg. Med. Chem. 2001, 9, 1625; Eur. J. Org. Chem. 2002, 873; J. Org. Chem. 2002, 67, 7483; C. R. Chimie 2003, 631; J. Comb. Chem. 2007, 9, 454.

[0008] Su uso en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de patologías relacionadas con déficit de actividad de neurotrofinas se ha descrito en el documento WO2004/000324. El documento US 2006/258648 desvela compuestos bicíclicos relacionados estructuralmente como inhibidores de aspartil proteasas útiles para tratar infecciones fúngicas.

[0009] Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar compuestos alternativos para la preparación de medicamentos para el tratamiento de patologías relacionadas con la actividad de las aspartil proteasas, y específicamente de la SAP2, y más específicamente para el tratamiento de infecciones sistémicas resistentes a fármacos de *Candida albicans* en pacientes inmunodeprimidos.

Descripción resumida de las figuras

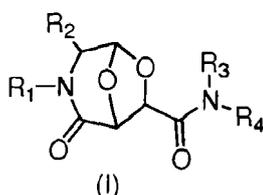
[0010]

FIGURA 1 – Infección vaginal con *C. albicans* SA40 en ratas tratadas por vía intravaginal con APG12 después de la exposición (1, 24, 48 h)

FIGURA 2 – Infección vaginal con *C. albicans* AIDS 68 en ratas tratadas por vía intravaginal con APG12 después de la exposición (1, 24, 48 h)

Descripción detallada de la invención

[0011] La presente invención se refiere a compuestos de fórmula (I)



en la que:

R1 es α -CH(R)COR5;

R es una cadena lateral de α -aminoácido, preferiblemente dicho α -aminoácido se selecciona entre el grupo que consiste en Gly, Leu, Val, Iie, Ala, Phe, Phg, Nle, Nva;

R2 es H, alquilo, arilo, alquilarilo, preferiblemente H, bencilo, metilo, isobutilo;

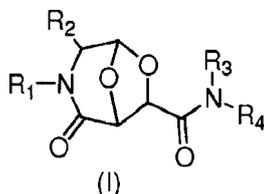
R3 y R4 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, alquilarilo, arilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, alcoxicarbonilo, -CH(cadena lateral de α -aminoácido)CH2OH; preferiblemente H, hidroxietilo, propargilo, -CH(cadena lateral de Leu)CH2OH;

R3 y R4 junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un ciclo de 5 a 8 miembros, eventualmente sustituido; preferiblemente piperidina, 4-hidroxietil-piperazina, 4-carboetoxi-piperazina, 4-bencil-piperazina, 4-fenil-piperazina, morfolina;

R5 se selecciona ente el grupo que consiste en -Oalquilo, -Oarilo, -NHalquilo, NHarilo, aminoácido, péptido; preferiblemente -OCH3, NHCH2CH(OH)CH2CONHBu;

incluyendo todas las posibles combinaciones de estereoisómeros.

[0012] Sorprendentemente, se ha descubierto que los compuestos de fórmula (I)



en la que:

R1 se selecciona entre el grupo que consiste en bencilo, fenilo, -CH(R)COR5; preferiblemente bencilo, -CH(R)COR5; R es una cadena lateral de α -aminoácido; preferiblemente dicho α -aminoácido se selecciona entre el grupo que consiste en Gly, Leu, Val, Iie, Ala, Phe, Phg, Nle, Nva;

R2 es H, alquilo, arilo, alquilarilo, preferiblemente H, bencilo, metilo, isobutilo;

R3 y R4 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, alquilarilo, arilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, alcoxicarbonilo, -CH(cadena lateral de α -aminoácido)CH2OH; preferiblemente H, hidroxietilo, propargilo, -CH(cadena lateral de Leu)CH2OH;

R3 y R4 junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un ciclo de 5 a 8 miembros, eventualmente sustituido; preferiblemente piperidina, 4-hidroxietil-piperazina, 4-carboetoxi-piperazina;

R5 se selecciona ente el grupo que consiste en -Oalquilo, -Oarilo, -NHalquilo, NHarilo, α -aminoácido, péptido; preferiblemente -OCH3, NHCH2CH(OH)CH2CONHBu;

incluyendo todas las posibles combinaciones de estereoisómeros;

son inhibidores potentes, tanto *in vitro*, como *in vivo* de SAP2, por tanto, pueden usarse para la preparación de medicamentos para tratar enfermedades infecciosas, preferiblemente relacionadas con *Candida albicans*, VIH, HTLV, *Plasodium falciparum*.

[0013] Un aspecto de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen al menos un compuesto de fórmula (I), en la que R1 es -CH(cadena lateral de α -aminoácido)COR5; preferiblemente dicho α -aminoácido se selecciona ente el grupo que consiste en Gly, Leu, Val, Iie, Ala, Phe, Phg, Nle, Nva; y al menos otro ingrediente, excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0014] De acuerdo con la invención:

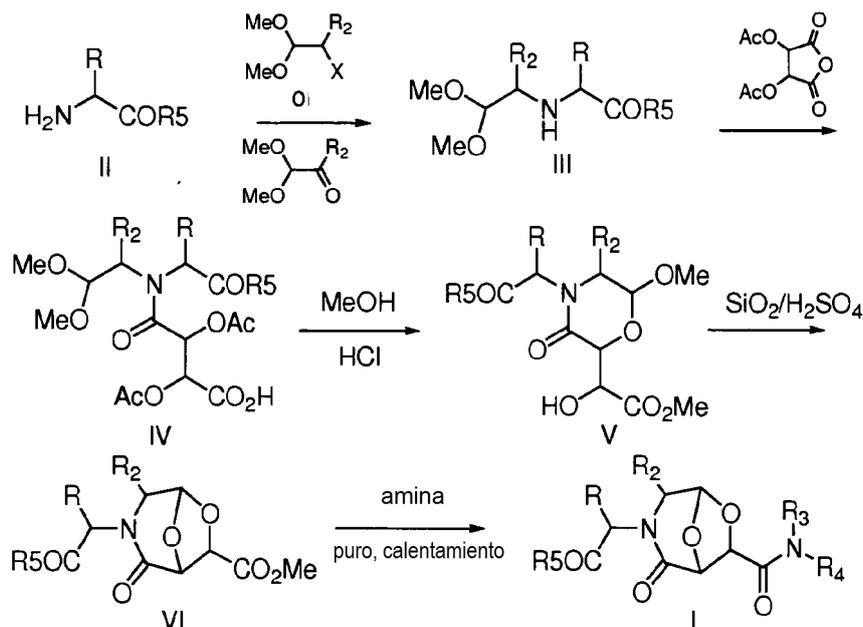
Alquilo se refiere a un radical de cadena lineal o ramificada, tal como: metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, etenilo, propenilo, butenilo, isobutenilo, acetilenilo, propinilo, butinilo, etc...;

Arilo se refiere a anillos aromáticos o heteroaromáticos que contienen heteroátomos, como N, O, S. Cadena lateral de aminoácido se refiere a diversas sustituciones, como una cadena lateral enlazada a un "aminoácido". El término "aminoácido" incluye cada uno de los α -aminoácidos naturales de las series L o D que tiene como "cadena lateral": -H para glicina; -CH3 para alanina; -CH(CH3)2 para valina; -CH2CH(CH3)2 para leucina; -CH(CH3)CH2CH3 para isoleucina; -CH2OH para serina; -CH(OH)CH3 para treonina; -CH2SH para cisteína; -CH2CH2SCH3 para metionina; -CH2-(fenilo) para fenilalanina; -CH2-(fenil)-OH para tirosina; -CH2-(indol) para triptófano; -CH2COOH para ácido aspártico; -CH2C(O)(NH2) para asparagina; -CH2CH2COOH para ácido glutámico; -CH2CH2C(O)NH2 para glutamina; -CH2CH2CH2-N(H)C(NH2)NH para arginina; -CH2-(imidazol) para histidina; -CH2(CH2)3NH2 para lisina,

comprendiendo las mismas cadenas laterales de aminoácido que portan grupos protectores adecuados.

Además, el término "aminoácido" incluye aminoácidos no naturales, tales como Ornitín (Orn), norleucina (Nle), norvalina (NVa), β -alanina, L o D α -fenilglicina (Phg), ácido diaminopropiónico, ácido diaminobutírico, ácido aminohidroxibutírico.

[0015] El esquema 1 resume la preparación sintética de compuestos de fórmula (I) como se ha descrito anteriormente, en la que R1 es -CH(R)COR5, R es una cadena lateral de α -aminoácido, a partir de derivados de α -aminoácidos (II) disponibles en el mercado o fácilmente sintetizables.



Esquema 1.

[0016] La alquilación reductora del derivado de aminoácido (II) con un derivado de dicarbonilo disponible en el mercado o fácilmente sintetizable, por ejemplo, dimetoxi-acetaldehído, en un disolvente prótico, preferiblemente metanol, usando un agente reductor, preferiblemente H₂ y un catalizador, preferiblemente Pd/C, proporciona la amina secundaria (III) después de agitar a temperatura ambiente, preferiblemente 16 h a 25 °C. Como alternativa, el compuesto (II) se calienta con un derivado de acetal disponible en el mercado o fácilmente sintetizable que contiene un grupo saliente bueno (X en el Esquema 1), por ejemplo bromoacetaldehído dimetilacetal, preferiblemente a 120 °C, en un disolvente polar, preferiblemente DMF, en presencia de una base, preferiblemente NEt₃, y en presencia de un catalizador, preferiblemente KI. La amina (III) se convierte sucesivamente en la amida (IV) a través de una reacción de acoplamiento con anhídrido di-O-acetil-tartárico. El tratamiento de (IV) en bruto con un ácido, en un disolvente polar, preferiblemente cloruro de tionilo en MeOH proporciona el acetal cíclico (V) que se calienta además en un disolvente no polar, preferiblemente en tolueno a reflujo durante 30 min, en presencia de un catalizador ácido, preferiblemente H₂SO₄ sobre gel de sílice, para producir (VI).

[0017] La síntesis de las amidas (I) se completa sin utilizar agentes activadores, por calentamiento del éster metílico (VI) en presencia de la amina pura, preferiblemente a 60 °C durante 18 h.

[0018] Los siguientes ejemplos se presentan para dar una ilustración no limitante de la presente invención.

Detalles experimentales

Ejemplo 1. Éster metílico del ácido (2S)-4-metil-2-[(1R,5S,7S)-2-oxo-7-(piperidin-1-carbonil)-6,8-dioxa-3-aza-biciclo[3,2,1]oct-3-il]-pentanoico [fórmula del compuesto (I), en la que R1 = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂(CH₂)₃CH₂-]

[0019] Una solución que contenía metil éster clorhidrato de L-leucina (2,9 g, 16 mmol), 2-bromo-1,1 -dimetoxi etano (1,9 ml, 2,7 g, 16 mmol), NEt₃ (6,7 ml, 48 mmol) y una cantidad catalítica de KI en DMF (190 ml) se agitó a 120 °C durante 3 días. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se diluyó con agua y se extrajo con DCM.

Después, la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, 1:1 de EtOAc/P.E.) para proporcionar el compuesto de fórmula (III), en la que R = cadena lateral de Leu, en forma de un aceite de color amarillo (1,2 g, rendimiento del 32%).

5 $[\alpha]_D^{24}$ -3,32 (c 1,0, CHCl₃); RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ 4,38 (t, J = 6 Hz, 1H), 3,65 (s, 3H), 3,30 (s, 3H), 3,29 (s, 3H), 3,24 (t, J = 6 Hz, 1H), 2,68 (dd, J₁ = J₂ = 6 Hz, 1H), 2,52 (dd, J₁ = J₂ = 6 Hz, 1H), 1,71 -1,55 (m, 2H), 1,44-1,37 (m, 2H), 0,86 (d, J = 4 Hz, 3H), 0,83 (d, J = 4 Hz, 3H); RMN ¹³C (CDCl₃, 200 MHz): δ 175,9 (s), 103,6 (d), 59,9 (d), 54,0 (c), 53,1 (c), 51,7 (c), 49,3 (t), 42,8 (t), 25,0 (d), 22,8 (c), 22,5 (c); EM m/z 233 (0,5), 202 (7,2), 174 (33), 158 (14), 75 (100); IR (CHCl₃) 2915, 1729, 1130, 1065 cm⁻¹; Anal. Calc. para C₁₁H₂₃NO₄ (233,30): C, 56,63; H, 9,94; N, 6,00. Encontrado: C, 57,49; H, 9,90; N, 6,24.

15 **[0020]** A una suspensión de anhídrido (S,S)-2,3-di-O-acetil-tartárico (1 g, 4,7 mmol) en DCM seco (4,5 ml) se le añadió, a 0 °C y en una atmósfera de nitrógeno, una solución del compuesto de fórmula (III), en la que R = cadena lateral de Leu, (1 g, 4,7 mmol) en DCM seco (2,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después de la evaporación del disolvente, el producto en bruto de fórmula (IV), en la que R = cadena lateral de Leu, se disolvió en MeOH (8 ml) y se añadió gota a gota cloruro de tionilo (292 µl, 4 mmol) a 0 °C. Después, se dejó que la mezcla alcanzara 60 °C y se agitó durante 2 h. El disolvente se retiró y el compuesto de fórmula (V) en bruto, en la que R = cadena lateral de Leu, se aisló en forma de un aceite de color amarillo y se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

20 **[0021]** Una solución de (V), en la que R = cadena lateral de Leu, (1,63 g, 4,7 mmol) en tolueno (8 ml) se añadió rápidamente a una suspensión a reflujo de SiO₂/H₂SO₄ (1 g) en tolueno (12 ml). Se dejó que la mezcla reaccionara durante 30 min, y después un tercio del disolvente se eliminó por destilación. La mezcla de reacción caliente se filtró a través de una capa de NaHCO₃ y, después de la evaporación del disolvente, el producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 1:2 de EtOAc/P.E.), proporcionando (VI), en la que R = cadena lateral de Leu, en forma de un sólido de color blanco (730 mg, rendimiento del 50% en tres etapas).

30 $[\alpha]_D^{24}$ 22,0 (c 1,0, MeOH); RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ 5,88 (d, J = 2 Hz, 1H), 5,09 (t, J = 8 Hz, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,59 (s, 1H), 3,72 (s, 3H), 3,64 (s, 3H), 3,50 (dd, J₁ = 12 Hz, J₂ = 2 Hz, 1H), 3,11 (dd, J₁ = 12 Hz, J₂ = 2 Hz, 1H), 1,67-1,60 (m, 2H), 1,46-1,32 (m, 1H), 0,88 (s, 3H), 0,84 (s, 3H); RMN ¹³C (CDCl₃, 200 MHz): δ 170,8 (s), 168,7 (s), 165,6 (s), 100,0 (d), 77,8 (d), 77,3 (d), 52,8 (d), 52,4 (c), 48,1 (t), 36,6 (t), 24,7 (d), 23,3 (c), 21,3 (c); EM m/z 315 (11), 256 (100), 240 (4); Anal. Calc. para C₁₄H₂₁N₀₇ (315,33): C, 53,33; H, 6,71; N, 4,44. Encontrado: C, 52,99; H, 5,58; N, 4,79.

35 **[0022]** Una solución que contenía (VI), en la que R = cadena lateral de Leu, (1 g, 3,2 mmol) y piperidina (6,3 ml, 63 mmol) se agitó a 60 °C durante una noche. Después, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida, y el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, 20:1 de DCM/MeOH) para proporcionar el compuesto de fórmula (VII), en la que R = cadena lateral de Leu, R₃ y R₄ = -CH₂(CH₂)₃CH₂- (correspondiente al compuesto de fórmula (I), en la que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂(CH₂)₃CH₂-), en forma de un aceite de color amarillo (816 mg, rendimiento del 70%).

45 $[\alpha]_D^{22}$ 33,6 (c 1,0, CHCl₃); RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): (mezcla de dos rotámeros) δ 5,79 (d, 1H, J = 1,4 Hz), 5,06-4,94 (m, 1H), 5,02 (s, 1H), 4,82 (s, 1H, menor), 4,71 (s, 1H, mayor), 3,62 (s, 3H, menor), 3,61 (s, 3H, mayor), 3,55-3,20 (m, 5H), 3,09 (d, J = 11,8 Hz, 1H), 1,67-1,34 (m, 9H), 0,86 (d, J = 4,8 Hz, 3H), 0,84 (d, J = 5,8 Hz, 3H); RMN ¹³C (CDCl₃, 200 MHz) (mezcla de dos rotámeros): δ 171,1 (s, menor), 170,8 (s, mayor), 167,6 (s, menor), 166,8 (s, mayor), 164,9 (s, menor), 164,8 (s, mayor), 99,6 (d, mayor), 99,5 (d, menor), 78,0 (d), 76,4 (d), 52,7 (c), 52,4 (d, mayor), 52,2 (d, menor), 48,6 (t, mayor), 47,7 (t, menor), 46,4 (t), 43,5 (t), 36,7 (t, mayor), 35,8 (t, menor), 26,4 (t), 25,5 (t), 24,7 (d), 24,5 (t), 23,2 (c), 21,5 (c); EM m/z 368 (M⁺), 309 (21), 312 (100); IR (CHCl₃) 2935, 1739, 1666 cm⁻¹. Anál. calc. para C₁₈H₂₉N₃O₆ (368,43): C, 58,68; H, 7,66; N, 7,60. Encontrado: C, 57,06; H, 7,50; N, 8,32.

50 **Ejemplo 2. Éster metílico del ácido (2S)-2-[(1R,5S,7S)-7-(4-metil-piperazin-1-carbonil)-2-oxo-6,8-dioxa-3-aza-biciclo[3,2,1]oct-3-il]-4-metil-pentanoico** [compuesto de fórmula (I), en la que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂CH₂N(CH₃)CH₂CH₂-]

55 **[0023]** El compuesto (I), en el que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂CH₂N(CH₃)CH₂CH₂- se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito para el compuesto (I), en el que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂(CH₂)₃CH₂-, partiendo del compuesto (VI), en la que R = cadena lateral de Leu, (150 mg, 0,48 mmol) y 1-metil piperazina (1,06 ml, 9,5 mmol). El compuesto (I) puro, en el que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂CH₂N(CH₃)CH₂CH₂-, (128 mg, rendimiento del 72%) se obtuvo en forma de un aceite de color amarillo.

65 $[\alpha]_D^{25}$ 28,1 (c 0,99, CHCl₃); RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ 5,85 (s, 1H), 5,12 (s, 1H), 5,05 (t, J = 8 Hz, 1H), 4,77 (s, 1H), 3,68 (s, 3H), 3,62-3,51 (m, 5H), 3,14 (d, J = 12 Hz, 1H), 2,42-2,33 (m, 4H), 2,72 (s, 3H), 1,73-1,65 (m, 2H), 1,49-1,42 (m, 1H), 0,92 (d, J = 6 Hz, 3H), 0,90 (d, J = 4 Hz, 3H); RMN ¹³C (CDCl₃, 200 MHz): δ 170,8 (s), 166,8 (s), 165,0 (s), 99,7 (d), 78,0 (d), 76,4 (d), 55,0, 54,6 (t), 52,8 (c), 52,5 (d), 48,6 (t), 46,1 (c), 45,4 (t), 42,3 (t), 36,9 (t), 24,8 (d), 23,3

(c), 21,6 (c); EM m/z 383 (23), 352 (2,4), 324 (9), 99 (55), 70 (100); IR (CHCl₃) 2866,1738,1670 cm⁻¹; Anál. calc. para C₁₈H₂₉N₃O₆ (383,44): C, 56,38; H, 7,62; N, 10,96. Encontrado: C, 55,12; H, 6,88; N, 12,01.

5 **Ejemplo 3. Éster metílico del ácido 4'-metil-(2'S)-2'-[(1R,5S,7S)-7-(morfolin-4-carbonil)-2-oxo-6,8-dioxa-3-aza-biciclo[3,2,1]oct-3-il]-pentanoico** [compuesto de fórmula (I), en la que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂CH₂OCH₂CH₂-]

10 **[0024]** El compuesto de fórmula (I), en la que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu) COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂CH₂OCH₂CH₂- se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito para el compuesto de fórmula (I), en la que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu) COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂(CH₂)₃CH₂-, partiendo del compuesto (VI), en la que R = cadena lateral de Leu, (100 mg, 0,32 mmol) y morfolina (0,55 ml, 6,3 mmol). El compuesto de fórmula (I) puro, en la que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂CH₂OCH₂CH₂- (95 mg, rendimiento del 65%) se obtuvo en forma de un aceite de color amarillo.

15 [α]_D²² 29,0 (c 1,0, CHCl₃); RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ 5,86 (d, J = 2 Hz, 1H), 5,16 (s, 1H), 5,06 (dd, J₁ = J₂ = 8 Hz, 1H), 4,76 (s, 1H), 3,70 (s, 3H), 3,67-3,52 (m, 9H), 3,15 (d, J = 12 Hz, 1H), 1,75-1,67 (m, 2H), 1,53-1,43 (m, 1H), 0,94 (d, J = 6 Hz, 3H), 0,92 (d, J = 6 Hz, 3H); RMN ¹³C (CDCl₃, 200 MHz): δ 170,8 (s), 99,8 (d), 84,6 (d), 78,0 (d), 66,8 (t), 66,6 (t), 52,8 (c), 52,5 (d), 48,6 (t), 46,0 (t), 42,7 (t), 36,8 (t), 24,8 (d), 23,3 (c), 21,6 (c); EM m/z 370 (14), 311 (60), 283 (19), 168 (100); IR (CHCl₃) 2932, 1735, 1668 cm⁻¹; Anal. Calc. para C₁₇H₂₆N₂O₇ (370,41): C, 55,13; H, 7,08; N, 7,56. Encontrado: C, 54,27; H, 6,40; N, 7,22.

25 **Ejemplo 4. Éster metílico del ácido (2S)-2-[(1R, 5S, 7S)-7-(4-bencil-piperazin-1-carbonil)-2-oxo-6,8-dioxa-3-aza-biciclo[3,2,1]oct-3-il]-4-metil-pentanoico** [compuesto de fórmula (I), en la que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂CH₂N(bencil)CH₂CH₂-]

30 **[0025]** El compuesto de fórmula (I), en la que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂CH₂N(bencil) CH₂CH₂- se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito para el compuesto de fórmula (I), en la que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂(CH₂)₃CH₂-, partiendo del compuesto de fórmula (VI), en la que R = cadena lateral de Leu, (100 mg, 0,32 mmol) y 1-bencil piperazina (1,1 ml, 6,3 mmol). El compuesto de fórmula (I) puro, en la que R₁ = -CH (cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂CH₂N(bencil)CH₂CH₂- (106 mg, rendimiento del 72%) se obtuvo en forma de un aceite de color amarillo.

35 [α]_D²³ 20,1 (c 1,1, CHCl₃); RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ 7,42-7,27 (m, 5H), 5,88 (s, 1H), 5,25-5,05 (m, 2H), 4,79 (s, 1H), 3,71 (s, 3H), 3,63-3,53 (m, 7H), 3,16 (d, J = 11,6 Hz, 1H), 2,51 -2,45 (m, 4H), 1,76-1,68 (m, 2H), 1,55-1,25 (m, 1H), 0,96 (d, J = 5, 3H), 0,93 (d, J = 6,2 Hz, 3H); RMN ¹³C (CDCl₃, 200 MHz): δ 170,8 (s), 166,8 (s), 165,0 (s), 129,1 (d), 128,3 (d), 127,3 (d), 99,7 (d), 78,0 (d), 76,4 (d), 62,9 (t), 52,9 (c), 52,7, 52,7 (t), 52,5 (d), 48,5 (t), 45,5, 42,4 (t), 36,8 (t), 24,8 (d), 23,3 (c), 21,6 (c); EM m/z 459 (10), 400 (1), 330 (1), 175 (19), 91 (100); IR (CHCl₃) 2940, 1740, 1672 cm⁻¹; Anal. Calc. para C₂₄H₃₃N₃O₆ (459,55): C, 62,73; H, 7,24; N, 9,14. Encontrado: C, 61,34; H, 6,82; N, 8,50.

40 **Ejemplo 5. Éster metílico del ácido (2S)-2-[(1R,5S,7S)-7-(4-feniletíl-piperazin-1-carbonil)-2-oxo-6,8-dioxa-3-aza-biciclo[3,2,1]oct-3-il]-4-metil-pentanoico** [compuesto de fórmula (I), en la que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂CH₂N(-CH₂CH₂Ph)CH₂CH₂-]

45 **[0026]** El compuesto de fórmula (I), en la que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂CH₂N(-CH₂CH₂Ph)CH₂CH₂- se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito para el compuesto de fórmula (I), en la que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂(CH₂)₃CH₂-, partiendo del compuesto de fórmula (VI), en la que R = cadena lateral de Leu, (100 mg, 0,32 mmol) y 1-feniletíl piperazina (1,2 ml, 6,3 mmol). El compuesto de fórmula (I) puro, en la que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH₃, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂CH₂N(-CH₂CH₂Ph)CH₂CH₂- (89 mg, rendimiento del 59%) se obtuvo en forma de un aceite de color amarillo.

50 [α]_D²⁵ 21,3 (c 0,9, CHCl₃); RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ 7,33-7,18 (m, 5H), 5,88 (d, J = 2 Hz, 1H), 5,17 (s, 1H), 5,09 (dd, J₁ = 8 Hz, J₂ = 6 Hz, 1H), 4,81 (s, 1H), 3,72 (s, 3H), 3,78-3,63 (m, 4H), 3,57 (dd, J₁ = 12 Hz, J₂ = 2 Hz, 1H), 3,18 (d, J = 12 Hz, 1H), 2,88-2,80 (m, 2H), 2,70-2,58 (m, 6H), 1,78-1,70 (m, 2H), 1,53-1,25 (m, 1H), 0,98 (d, J = 6 Hz, 3H), 0,94 (d, J = 6 Hz, 3H); RMN ¹³C (CDCl₃, 200 MHz): δ 170,6 (s), 166,5 (s), 164,8 (s), 138,5 (s), 128,4 (d), 128,3 (d), 126,1 (d), 99,5 (d), 77,7 (d), 76,9 (d), 59,5 (t), 52,6 (c), 52,4, 52,2 (t), 51,9 (d), 48,2, 44,3 (t), 41,3 (t), 36,5 (t), 32,4 (t), 24,4 (d), 22,8 (c), 21,2 (c); EM m/z 414 (1), 382 (95), 56(100); IR (CHCl₃) 2923, 1740, 1672 cm⁻¹; Anál. calc. para C₂₅H₃₅N₃O₆ (473,57): C, 63,41; H, 7,45; N, 8,87. Encontrado: C, 62,28; H, 7,01; N, 8,96.

60 **Ejemplo 6. (3-Butilcarbamoil-2-hidroxi-propil)-amida del ácido (2S)-4-metil-2-[(1R,5S,7S)-2-oxo-7-(piperidin-1-carbonil)-6,8-dioxa-3-aza-biciclo[3,2,1]oct-3-il]-pentanoico** [compuesto de fórmula (I), en la que R₁ = -CH(cadena lateral de Leu)COR₅, R₂ = H, R₃ y R₄ = -CH₂CH₂OCH₂CH₂-, R₅ = -NHCH₂CH(OH)CH₂CONHBu]

65 **[0027]** A una solución de sal clorhidrato del éster metílico del ácido 4-amino-3-hidroxi-bufírico, (37 mg, 0,22 mmol)

5 en DCM (4 ml) se le añadieron, en una atmósfera de nitrógeno y a 0 °C, PyBrOP (102 mg, 0,22 mmol), ácido (2S)-4-metil-2-[(1R,5S,7S)-2-oxo-7-(piperidin-1-carbonil)-6,8-dioxa-3-aza-biciclo[3,2,1]oct-3-il]-pentanoico (80 mg, 0,22 mmol), obtenido previamente por hidrólisis básica del éster del compuesto de fórmula (I), en la que R1 = -CH(cadena lateral de Leu)COOCH3, R2 = H, R3 y R4 = -CH2(CH2)3CH2-, con LiOH y DIPEA (85 µl, 0,5 mmol). Se dejó que la solución resultante alcanzara temperatura ambiente y se agitó durante una noche. Después, la mezcla de reacción se lavó con una solución saturada de NaHCO3, KHSO4 acuoso al 5% y salmuera, y se secó sobre Na2SO4. Después de la evaporación del disolvente, el producto en bruto se diluyó en EtOAc y se dejó durante tres horas a 4 °C para permitir la precipitación del PyBrOP. Después de la purificación por cromatografía ultrarrápida, el compuesto resultante (40 mg, 0,08 mmol) se trató con n-butil amina (168 µl, 1,7 mmol) en una mezcla de THF (200 µl) y dos gotas de H2O a 50 °C durante tres días. La filtración de la mezcla de reacción sobre Amberlyst 15 y purificación adicional por cromatografía en columna (gel de sílice, 20:1 de DCM/MeOH) proporcionó 30 mg del compuesto de fórmula (I), en la que R1 = -CH(cadena lateral de Leu)COR5, R2 = H, R3 y R4 = -CH2CH2OCH2CH2-, R5 = -NHCH2CH(OH)CH2CONHBu en forma de un aceite incoloro.

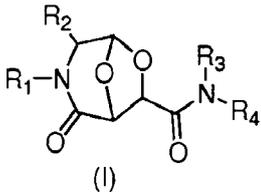
15 RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ 6,81-6,68 (m, 1H), 6,41 -6,22 (m, 1H), 5,90, 5,86 (s, 1H, mezcla de dos diaestereoisómeros), 5,14-4,81 (m, 3H), 4,13-3,92 (m, 1H), 3,66-3,35 (m, 6H), 3,36-3,02 (m, 4H), 2,28 (d, J = 5,2 Hz, 2H), 1,88-1,20 (m, 13H), 0,97-0,87 (m, 9H); RMN ¹³C (CDCl₃, 200 MHz): δ 171,5 (s), 170,2 (s), 168,0 (s), 164,8 (s), 99,6 (d), 77,9 (d), 67,9 (d), 54,1, 53,9 (d), 47,6 (t), 46,6 (t), 44,5 (t), 43,6 (t), 39,4 (t), 36,4 (t), 34,9 (t), 31,6 (t), 26,4 (t), 25,6 (t), 24,9 (d), 24,6 (t), 23,1 (c), 22,0 (c), 20,3 (t), 13,9 (c); EM m/z 510 (3), 309 (34), 112 (69), 84 (100).

20 **[0028]** Los siguientes ejemplos se presentan para dar una ilustración no limitante de la actividad *in vitro* e *in vivo* de compuestos seleccionados de la presente invención.

25 **Ensayo enzimático proteasa**

[0029] Método espectrofotométrico: la actividad proteasa de los diversos compuestos de fórmula (I) se midió mediante un ensayo espectrofotométrico con respecto a la actividad de la pepstatina a la misma concentración: cada ensayo contenía 50 µl de muestra en 0,4 ml de BSA al 1% (p/v) en citrato sódico 50 mM, pH 3,2 y 50 µl de solución de proteasa (1 µg/ml). Después de 30 min a 37 °C, se añadió 1 ml de ácido tricloroacético al 10% (p/v). Los tubos se almacenaron en hielo durante 30 min, y después se centrifugaron (3000 g) durante 10 min. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 280 nm. Control: BSA al 1% en tampón citrato. Una unidad de la enzima se catalizó a ΔA₂₈₀ de 1 min⁻¹. Con la proteasa pura, el ensayo fue proporcional a la concentración de la enzima durante el intervalo 0,1-0,4 de ΔA₂₈₀ y una detección límite de 1 µg (De Bernardis F., Sullivan P.A., Cassone A. Medical Mycology 2001, 39, 303).

35 **Tabla 1.** Actividad *in vitro* hacia SAP2 de compuestos representativos de la presente invención. 1% es el porcentaje de inhibición con respecto a pepstatina a la misma concentración de 10 µM.

 <p style="text-align: center;">(I)</p>						
Comp.	R1	R2	R3	R4	R5	1%
1	-CH(cadena lateral de Leu)COR5	H	-CH2(CH2)3CH2-		OCH3	37
2	-CH(cadena lateral de Leu)COR5	H	CH2CH2OCH2CH2		OCH3	32
3	-CH(cadena lateral de Leu)COR5	H	-CH2(CH2)3CH2-		NHCH2CH(OH)CH2CONHBu	22
4	-CH2Ph	H	H	-CH2CH2OH	-	36
5	-CH2Ph	H	H	-CH(cadena lateral de Leu)CH2OH		41
6	-CH2Ph	H	-CH2(CH2)3CH2-		-	42
7	-CH2Ph	H	-(CH2)2NCH2CH2OH(CH2)2-		-	34
8		H	-CH2CH2OCH2CH2-		-	31
9	-CH2Ph	H	CH2CH2NC(O)OCH2CH3CH2-		-	37
10	-CH2Ph	H	H	-(CH2)3OH	-	12

Comp.	R1	R2	R3	R4	R5	I%
11	-CH ₂ Ph	H	H	-CH(cadena lateral de Pro)CH ₂ OH		24
12	-CH ₂ Ph	H	H	-CH(cadena lateral de D-Pro)CH ₂ OH		17
13	-CH ₂ Ph	H	H	-CH(cadena lateral de Phg)CH ₂ OH		16
14	-CH ₂ Ph	H	H	-CH(cadena lateral de Phe)CH ₂ OH		19
15	-CH ₂ Ph	H	H	-CH(cadena lateral de D-Phe)CH ₂ OH		15
16	-CH ₂ Ph	- CH ₂ Ph	H	-(CH ₂) ₃ CH ₃	-	17
17	-CH ₂ Ph	- CH ₂ Ph	H	-(CH ₂) ₅ CH ₃	-	21
18	-CH ₂ Ph	- CH ₂ Ph	H	-CH ₂ CF ₃	-	17
19	-CH ₂ Ph	- CH ₂ Ph	-CH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ -		-	25
20	-CH ₂ Ph	- CH ₂ Ph	-CH ₂ CH ₂ SCH ₂ CH ₂ -		-	28
21	-CH ₂ Ph	- CH ₂ Ph	-(CH ₂) ₂ NCH ₂ CH ₂ OH(CH ₂) ₂ -		-	31

Ensayo *in vivo*

- 5 **Infección vaginal experimental:** para la infección vaginal experimental, se adoptó un modelo vaginal de rata descrito previamente (De Bernardis, F.; Boccanera, M.; Adriani, D.; Spreghini, E.; Santoni, G.; Cassone, A. *Infect. Immun.*, **1997**, 65, 3399).

10 **[0030]** En resumen, a ratas Wistar hembras ooforectomizadas (80-100 g; Charles River Calco, Italia) se les inyectó por vía subcutánea 0,5 mg de benzoato de estradiol (Estradiolo, Amsa Farmaceutici srl, Roma, Italia). Seis días después del primer estradiol se inoculó a los animales, por vía intravaginal, 10⁷ células de levadura en 0,1 ml de solución salina de cada cepa de *C. albicans* sometida a ensayo. El inóculo se dispensó en la cavidad vaginal a través de una jeringa equipada con una boquilla calibrada multipropósito (Combitip; PBI, Milán, Italia). Las células de levadura se habían cultivado previamente en caldo YPD (extracto de levadura 1%; peptona 2%; dextrosa 2%) a 28 °C en un agitador giratorio (200 rpm), se recogieron por centrifugación (1500 g), se lavaron, se contaron en un hemocitómetro, y se suspendieron para dar el número requerido en la solución salina. El número de células en el fluido vaginal se contó cultivando muestras de 100 µl (usando a un asa de plástico calibrada, Disponico, PBI, Milán, Italia) tomadas de cada uno de los animales, en agar Sabouraud que contenía cloramfenicol (50 µg/ml) como se ha descrito previamente. La rata se consideró infectada cuando al menos 1 UFC estuvo presente en el lavado vaginal, es decir, un recuento de > 10³ UFC/ml.

25 **[0031]** Como un ejemplo representativo para estudios *in vivo*, uno de los compuestos de fórmula (I), como se ha descrito anteriormente y en lo sucesivo denominado APG12, correspondiente al compuesto 6 de la Tabla 1, se administró por vía intravaginal a concentraciones de 10 µM, 1 h, 24 h y 48 h después de la exposición intravaginal a *Candida albicans* con dos cepas diferentes, concretamente SA40 y la AIDS68 resistente a fármaco. De forma similar, se administró un control positivo (pepstatina 10 µg; fluconazol 10 µg) y un control negativo (solución salina estéril).

30 **[0032]** El perfil de eliminación de *Candida albicans* en ratas tratadas por vía intravaginal con APG12 es similar a la aceleración observada en ratas tratadas con la pepstatina inhibidora de SAP2 natural, y en ratas tratadas con fluconazol (Tabla 2 y Figura 1). De mayor importancia, la aceleración de la eliminación de *Candida albicans* en la cepa AIDS68 resistente a fármaco muestra eficacia de la pepstatina inhibidora de SAP2 natural APG12 y de APG12, mientras que el fluconazol es ineficaz, mostrando un perfil de eliminación similar al del control sin tratar (Tabla 3 y Figura 2).

35

TABLA 2. Aceleración de eliminación de *Candida* SA40 en ratas tratadas por vía intravaginal con APG12 después de exposición (1, 24, 48 h)

DÍAS	SA40 + APG12	SA40 + pepstatina	SA40
0	>100	>100	>100
1	70 ± 1,3	56,8 ± 2	>100
2	57,6 ± 1,4	51 ± 1,2	>100
5	39,2 ± 3	32,4 ± 2,5	80 ± 2,6
7	30,6 ± 1,8	28 ± 1,5	66 ± 2,1
14	14,4 ± 1,6	9,4 ± 1,4	26,2 ± 1,8
21	8 ± 1,5	5 ± 1,3	12,8 ± 1,2
28	1,2 ± 0,7	0	5,8 ± 1,6

Todos los valores x 1000; SA40 : control sin tratar; Día de comienzo 1, todas las diferencias entre APG12-tratado y control sin tratar son estadísticamente significativas; (P <0,01, ensayo U de Mann-witney)

5

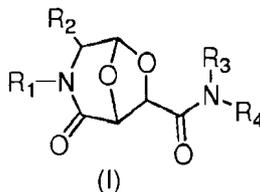
TABLA 3. Aceleración de eliminación de *Candida* AIDS68 en ratas tratadas por vía intravaginal con APG 12 después de exposición (1, 24, 48 h)

DÍAS	AIDS68 + APG12	AIDS68 + pepstatina	AIDS68 + fluconazol	AIDS68
0	>100 ± 0	>100 ± 0	>100 ± 0	>100 ± 0
1	71,8 ± 1,3	58,4 ± 1,0	100 ± 0	100 ± 0
2	62,6 ± 1,5	52,0 ± 1,3	93 ± 4,3	100 ± 0
5	40,6 ± 1,4	37,2 ± 1,6	61 ± 2,5	71 ± 1,6
7	23,2 ± 1,4	30,0 ± 1,2	44 ± 2,9	50 ± 3,5
14	12,8 ± 1,2	19,8 ± 0,8	18,7 ± 3,8	25 ± 1,6
21	3,4 ± 1,7	3,8 ± 1,9	11,7 ± 0,7	10,7 ± 1,6
28	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	7,7 ± 3

Todos los valores x 1000; AIDS68 : control sin tratar; Día de comienzo 1, todas las diferencias entre APG12-tratado y control sin tratar son estadísticamente significativas; (P <0,01, ensayo U de Mann-witney)

REINVIDICACIONES

1. Los compuestos de fórmula (I)



5

en la que:

R1 es -CH(R)COR5;

10 R es una cadena lateral de α -aminoácido; R2 es H, alquilo, arilo, alquilarilo;
R3 y R4 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, alquilarilo, arilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, alcocarbonilo, -CH(cadena lateral de α -aminoácido)CH2OH; R3 y R4 junto con el átomo de nitrógeno al que están conectados pueden formar un ciclo de 5 a 8 miembros, opcionalmente sustituido;

15 R5 se selecciona ente el grupo que consiste en -Oalquilo, -Oarilo, -NHalquilo, NHarilo, aminoácido, péptido;

comprendiendo todas las combinaciones posibles de estereoisómeros;

20 en la que la cadena lateral de aminoácido se refiere a diversas sustituciones, como una cadena lateral enlazada a un "aminoácido"; el término "aminoácido" incluye cada uno de los α -aminoácidos naturales de las series L o D que tiene como "cadena lateral": -H para glicina; -CH3 para alanina; -CH(CH3)2 para valina; -CH2CH(CH3)2 para leucina; -CH(CH3)CH2CH3 para isoleucina; -CH2OH para serina; -CH(OH)CH3 para treonina; -CH2SH para cisteína; -CH2CH2SCH3 para metionina; -CH2-(fenilo) para fenilalanina; -CH2-(fenil)-OH para tirosina; -CH2-(indol) para triptófano; -CH2COOH para ácido aspártico; -CH2C(O)(NH2) para asparagina; -CH2CH2COOH para ácido glutámico; -CH2CH2C(O)NH2 para glutamina; -CH2CH2CH2-N(H)C(NH2)NH para arginina; -CH2-(imidazol) para histidina; -CH2(CH2)3NH2 para lisina, comprendiendo las mismas cadenas laterales de aminoácido que portan grupos protectores adecuados; el término "aminoácido" incluye aminoácidos no naturales seleccionados entre el grupo que consiste en Ornitín (Orn), norleucina (Nle), norvalina (NVa), β -alanina, L o D α -fenilglicina (Phg), ácido diaminopropiónico, ácido diaminobutírico y ácido aminohidroxibutírico.

30

2. Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1, en la que:

R2 es H, bencilo, metilo, isobutilo;

35 3. Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 2, en la que:

R se selecciona ente el grupo que consiste en aquellos de Gly, Leu, Val, lie, Ala, Phe, Phg, Nle, Nva.

40 4. Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 3, en la que:

R3 y R4 se seleccionan independientemente en el grupo que consiste en H, hidroxietilo, propargilo, -CH(cadena lateral de Leu) CH2OH;

45 R3 y R4 junto con el átomo de nitrógeno al que están conectados pueden formar un anillo, seleccionado en el grupo que consiste en piperidina, 4-hidroxietil-piperazina, 4-metil-piperazina, 4-carboetoxi-piperazina, 4-feniletíl-piperazina, 4-bencil-piperazina, morfolina.

5. Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 4, en la que:

50 R3 es H y R4 se selecciona ente el grupo que consiste en H, hidroxietilo, propargilo, -CH(cadena lateral de Leu)CH2OH; o R3 y R4 junto con el átomo de nitrógeno al que están conectados pueden formar un anillo, seleccionado entre el grupo que consiste en piperidina, 4-hidroxietil-piperazina, 4-carboetoxi-piperazina.

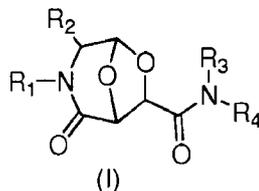
6. Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 5, en la que:

55 R es cadena lateral de Leu.

7. El compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la reivindicación 1-6 para su uso como un medicamento.

8. Uso de un compuesto de fórmula (I), en la que:

R1 se selecciona ente el grupo que consiste en bencilo, fenilo, -CH(R)COR5;



5 R es una cadena lateral de α -aminoácido;
 R2 es H, alquilo, arilo, alquilarilo;
 R3 y R4 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, alquilarilo, arilo, hidroxialquilo, alcoxialquilo, alcocarbonilo, -CH(cadena lateral de α -aminoácido)CH2OH;
 10 R3 y R4 junto con el átomo de nitrógeno al que están conectados pueden formar un ciclo de 5 a 8 miembros, opcionalmente sustituido;
 R5 se selecciona ente el grupo que consiste en -Oalquilo, -Oarilo, -NHalquilo, NHarilo, aminoácido, péptido;

15 comprendiendo todas las combinaciones posibles de estereoisómeros;

en la que la cadena lateral de aminoácido se refiere a diversas sustituciones, como una cadena lateral enlazada a un "aminoácido"; el término "aminoácido" incluye cada uno de los α -aminoácidos naturales de las series L o D que tiene como "cadena lateral": -H para glicina; -CH3 para alanina; -CH(CH3)2 para valina; -CH2CH(CH3)2 para leucina; -CH(CH3)CH2CH3 para isoleucina; -CH2OH para serina; -CH(OH)CH3 para treonina; -CH2SH para cisteína; -CH2CH2SCH3 para metionina; -CH2-(fenilo) para fenilalanina; -CH2-(fenil)-OH para tirosina; -CH2-(indol) para triptófano; -CH2COOH para ácido aspártico; -CH2C(O)(NH2) para asparagina; -CH2CH2COOH para ácido glutámico; -CH2CH2C(O)NH2 para glutamina; -CH2CH2CH2-N(H)C(NH2)NH para arginina; -CH2-(imidazol) para histidina; -CH2(CH2)3NH2 para lisina, comprendiendo las mismas cadenas laterales de aminoácido que portan grupos protectores adecuados; el término "aminoácido" incluye aminoácidos no naturales seleccionados entre el grupo que consiste en Ornitín (Orn), norleucina (Nle), norvalina (NVa), β -alanina, L o D α -fenilglicina (Phg), ácido diaminopropiónico, ácido diaminobutírico y ácido aminohidroxibutírico.

30 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 de un compuesto de fórmula (I) en la que:

35 R1 se selecciona ente el grupo que consiste en bencilo, -CH(R)COR5, en el que dicha R es un α -aminoácido seleccionado ente el grupo que consiste en aquellos de Gly, Leu, Val, Ile, Ala, Phe, Phg, Nle, Nva.

R2 se selecciona entre el grupo de H, bencilo, metilo, isobutilo;

R3 y R4 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, hidroxietilo, propargilo, -CH(cadena lateral de Leu)CH2OH;

40 R3 y R4 junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos pueden formar un ciclo, seleccionado entre el grupo que consiste en piperidina, 4-hidroxi-piperazina, 4-carboetoxi-piperazina.

10. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8-9 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas asociadas con patógenos microbianos que expresan actividad de aspartil-proteasa.

45 11. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 10 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas asociadas con patógenos, seleccionados entre el grupo que consiste en *Candida albicans*, VIH, HTLV, *Plasmodium falciparum*.

50 12. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 11 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades infecciosas resistentes a fármaco asociadas con *Candida albicans*.

55 13. Composición farmacéutica que contiene al menos un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, y al menos otro ingrediente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Infección vaginal con *C. albicans* SA40 en ratas tratadas por vía intravaginal con APG12 después de la exposición (1, 24, 48 h)

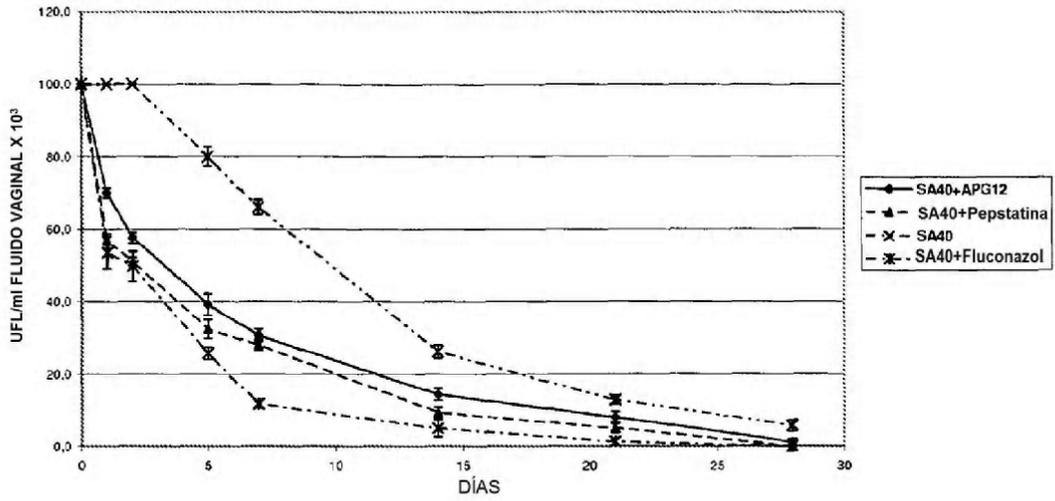


FIGURA 1

Infección vaginal con *C. albicans* AIDS 68 en ratas tratadas por vía intravaginal con APG12 después de la exposición (1, 24, 48 h)

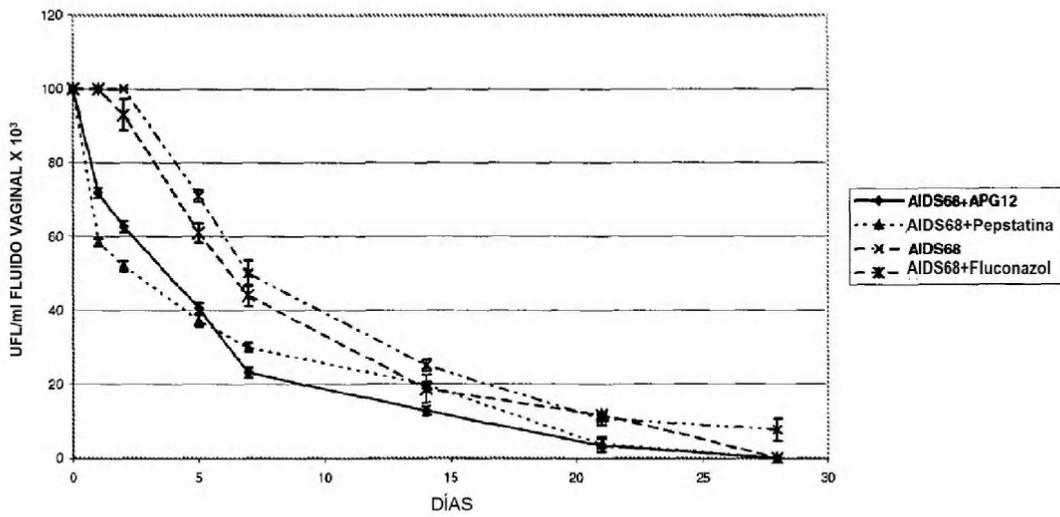


FIGURA 2