

**DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO**

N.º 99 653

REQUERENTE: SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION, norte-americana (Estado de Pennsylvania), com sede em One Franklin Plaza, Philadelphia, Pennsylvania 19101, Estados Unidos da América

EPÍGRAFE: "Processo de preparação de inibidores de protease de HIV, por exemplo o éster metílico de 3-benzil-5-(alanil)-1-aminoetil)-2,3,6,7-tetra-hidro-N-azepinil-2-propionil-valinilvalina e de composições farmacêuticas"

INVENTORES: James Francis Callahan, William Francis Huffman, Michael Lee Moore e Kenneth Allen Newlander

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

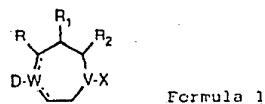
Estados Unidos da América em 30 de Novembro de 1990 sob o nº. 07/620 978.

PATENTE N°. 99 653

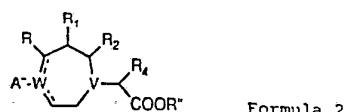
"Processo de preparação de inibidores de protease de HIV, por exemplo o éster metílico de 3-benzil-5-(alanil-1-aminoetil)-2,3,6,7-tetra-hidro-N-azepinil-2-propionil-valinilvalina e de composições farmacêuticas"

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de preparação de compostos miméticos de péptidos com uma conformação do esqueleto peptídico restringida, possuindo a fórmula:



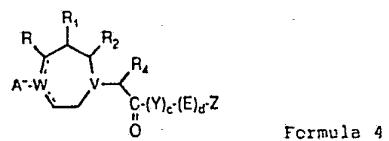
O processo compreende: a reacção de um composto de fórmula 2:



com um composto de fórmula 3:



para originar um composto de fórmula 4:

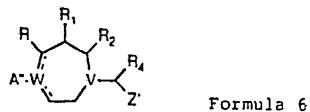


ou, fazer reagir um composto de fórmula 4 com um composto de fórmula 5:

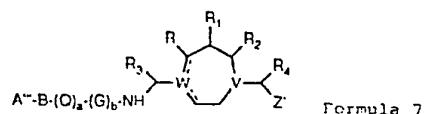


e, opcionalmente, remover o grupo protector de amino; ou

converter um composto de fórmula 2 num composto de fórmula 6:



com quaisquer grupos protectores necessários, e quando adequado, fazer reagir um composto de fórmula 6 com $A''-B-(Q)_a(G)_b-H$ para se obter um composto de fórmula 7:



e, opcionalmente, remover o grupo A'' e quaisquer grupos protectores em Z' .

Um composto deste invento é, por exemplo, o éster metílico de 3-benzil-5-(alanil-1-aminoetil)-2,3,6,7-tetra-hidro-N-azepi-nil-2-propionil-valinilvalina.

O invento refere-se ainda ao processo de preparação de composições farmacêuticas.



MEMÓRIA DESCRIPTIVA

O presente invento refere-se a compostos contendo mimetistas químicos que constrangem a conformação de péptidos. Estes compostos são inibidores das proteases do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e são úteis para o tratamento da infecção por HIV e para o tratamento da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA).

Os compostos deste invento são também inibidores da renina e portanto são úteis no tratamento de hipertensão.

Este invento refere-se ainda a composições farmacêuticas que compreendem um composto deste invento e um transportador farmacologicamente aceitável.

Este invento refere-se também a processos de tratamento da SIDA e a processos de prevenção e/ou tratamento de infecção pelo HIV. Estes processos compreendem a administração, a um mamífero que dela necessite, de uma quantidade eficaz de um composto deste invento.

Antecedentes do invento

O retrovírus HIV, o qual é um vírus da família dos Retroviridae, é o agente etiológico da SIDA e de complexos relacionados com a SIDA. A replicação viral ocorre apenas dentro de células hospedeiras e é dependente das funções celulares do hospedeiro. A produção de proteínas virais funcionais é crítica para esta replicação. A síntese de proteínas é acompanhada pela tradução dos quadros de leitura abertos nas construções de poliproteína, correspondendo aos quadros de leitura gag, pol e env, que são processados, pelo menos em parte, por uma protease viral nas proteínas funcionais. A actividade proteolítica proporcionada pela protease viral no processamento de poliproteínas não pode ser proporcionada pelo hospedeiro e é essencial para o ciclo de vida do retrovírus. Descreveram-se processos para expressar proteases virais em E. coli por Debouck, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8903-06 9 (1987) e Graves, et al., Proc. Natl.



Acad. Sci. USA, 85, 2449-53 (1988) para o vírus HIV-1. De facto, verificou-se que os retrovírus que não contêm a protease, ou contêm uma sua forma mutante, carecem de infectividade. Ver Katoh et al., Virology, 145, 280-92 (1985), Crawford et al., J. Virol., 53, 899-907 (1985) e Debouck et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 8903-6 (1987). A inibição das proteases retrovirais, tais como a protease do HIV, representa um processo de terapia para doenças retrovirais, tais como a SIDA. Existe uma necessidade de compostos que inibem a actividade de proteases retrovirais para uso farmacêutico, para proporcionar uma terapia para doenças que sejam causadas por estes retrovírus.

As patentes EP-A 352 000 e EP-A 337 714, as quais se incorporam aqui como referência, descrevem compostos do tipo péptido que inibem proteases retrovirais. Nenhuma destas referências descreve compostos possuindo a conformação do esqueleto peptídico constrangida, que é a característica significativa dos compostos inibidores do presente invento.

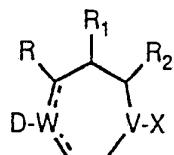
Nas seguintes publicações referem-se mimetistas de enrolamento gama: Huffman et al., Peptides, Chemistry and Biology, Proceedings of the Tenth American Peptide Symposium, (Marshall, G., ed.), ESCOM, Lüden, 1988, pp. 105-8. Huffman et al., Synthetic Peptides: Approaches to Biological Problems. UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, Vol. 86 (Tam, J. e Kaiser, E., eds.) Alan R. Liss, Inc., Nova Iorque, 1988. Huffman et al., 10th American Peptide Symposium, Abstract, Maio 1987. Callahan et al., 30th Organic Symposium, Abstract, Junho 1987. Referiu-se uma falta significativa de actividade biológica.

As estruturas cristalinas de raio-X, de certos inibidores de enzimas baseados no ácido aspártico ligados aos locais activos da enzima revelam que uma conformação C-7 ou uma conformação de enrolamento gama próxima do aminoácido no local P1 é compatível com o farmacoforo para inibição. Verificámos que os compostos contendo mimetistas sintéticos, os quais constrangem a conformação do esqueleto do péptido, são inibidores da protease do HIV. Eles são também inibidores da renina.



Descrição do Invento

Os compostos deste invento são ilustrados pela fórmula I que se segue:



na qual:

D é A' ou $A-B-(Q)_a-(G)_b-NH$;

X é ;

V e W são, independentemente um do outro, N ou C;
uma das ligações indicadas por — é uma ligação dupla e a outra é uma ligação simples ou, quando W é N, ambas — são ligações simples;

R é hidrogénio ou OH, ou quando W é N, R é =O;

R_1 é alquilo C_{1-6} , $(CH_2)_nAr$, $(CH_2)_nHet$, $(CH_2)_nCONHR'$, $(CH_2)_nOR'$ ou $(CH_2)_nSR'$;

R_2 é:

a) 2H, quando V é N;

b) OH, OR', =CHR' ou NHR' quando V é C;

c) =O quando V é N, D é e X
é ou quando W e V são ambos N;

A' é hidrogénio, alquilo C_{1-6} , benzilo, halobenzilo, di-halobenzilo ou tosilo;

A é hidrogénio ou um grupo protector de amino;

B é um D ou L aminoácido ou é uma ligação covalente;

Q é um D ou L aminoácido seleccionado de entre Ser, Thr, Asp, His, Cys, Arg e Ala;

G é Glx, Asx, Ala, β -Ala, Arg, Gly, Ile, Leu, Lys, Ser, Thr, Val, Met ou His;

Y e E são, independentemente um do outro, um D ou L

aminoácido;

a, b, c e d são, independentemente uns dos outros, 0 ou 1;

Z é hidrogénio $(\text{CH}_2)_n\text{OR}'$, $(\text{CH}_2)_n\text{NHR}'$, alquilo C_{1-6} , $(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$, $\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{OR}'$, $\text{NH}(\text{CH}_2)_p\text{OR}'$, $\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{SR}'$ ou $\text{NH}(\text{CH}_2)_p\text{SR}'$;

R_3 e R_4 são, independentemente um do outro, hidrogénio, alquilo C_{1-6} , $(\text{CH}_2)_n\text{Het}$, $(\text{CH}_2)_n\text{Ar}$, $(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}'$, $(\text{CH}_2)_n\text{OR}'$, $(\text{CH}_2)_n\text{SR}'$, $(\text{CH}_2)_n\text{NHR}'$, $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ou $(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$;

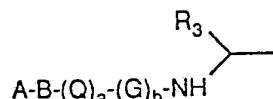
R' é hidrogénio, alquilo C_{1-4} ou benzilo;

n é 0 a 3;

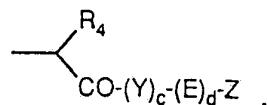
p é 1 a 3;

Het é indolilo ou imidazolilo, ou piridilo ou tienilo opcionalmente substituídos com um ou dois alquilo C_{1-4} , OR' ou SR'; e

Ar é fenilo opcionalmente substituído com um ou dois alquilo C_{1-4} , OR', NO_2 , NH_2 , halogéneo, CF_3 ou SR'; ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.



Na fórmula I, D é preferivelmente



e também, X é preferivelmente

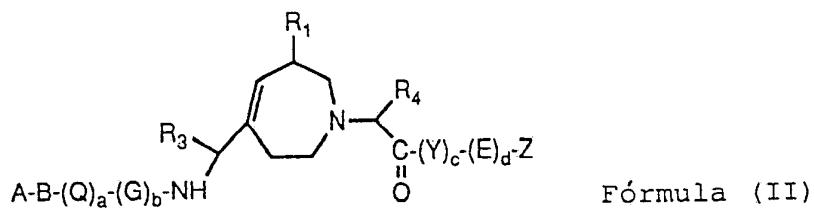
Estão também incluídos neste invento sais de adição farmaceuticamente aceitáveis, complexos ou pró-drogas dos compostos deste invento. As pró-drogas são consideradas como sendo quaisquer transportadores ligados covalentemente que libertam in vivo a droga progenitora activa de acordo com a fórmula I.

Deve-se notar que, na fórmula I, A compreende a porção (1) no grupo amino quando a e b são 0 e B é uma ligação covalente, (2) no grupo amino do aminoácido de B quando B é um aminoácido, (3) no grupo amino do aminoácido de Q quando B é uma ligação covalente e a é 1, ou (4) no grupo amino do aminoácido de G quando B é uma ligação covalente e a é 0. Z representa a porção terminal no grupo carbonilo quando X é $\text{CH}(\text{R}_4)\text{C}(=\text{O})-(\text{Y})_c-(\text{E})_d-\text{Z}$ e c e d são 0; ou no grupo carbonilo do aminoácido de Y quando c é 1 e d é 0; ou no grupo carbonilo do aminoácido de E quando d é 1.

~~SECRET~~

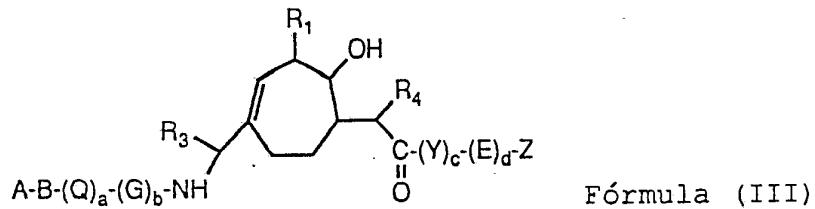
Na fórmula I, o grupo protector de amino na definição de A pode ser t-butiloxicarbonilo (Boc), benziloxicarbonilo (Cbz), p-clorobenziloxicarbonilo (Clz), 2,4-diclorobenziloxicarbonilo (Cl₂ Z), alcanoílo tal como acetilo (Ac), ou tosilo (Tos). Podem-se também utilizar outros grupos protectores de amino conhecidos na arte.

Um grupo sub-genérico de compostos de fórmula I são as amidas reduzidas possuindo a seguinte fórmula II:



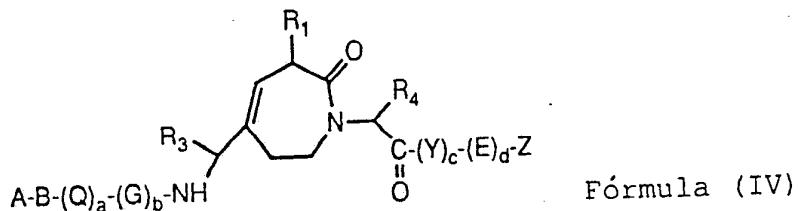
na qual R₁, A, B, Q, G, Y, E, a, b, c, d, R₃, R₄ e Z são definidos como na fórmula I.

Outro grupo sub-genérico de compostos de fórmula I são compostos de hidroxietileno os quais são representados pela seguinte fórmula III:

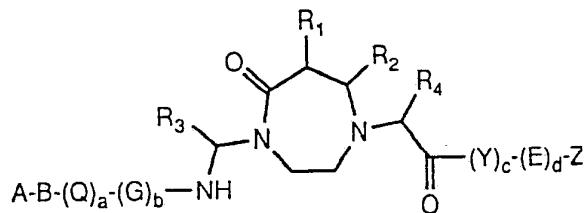


na qual R₁, A, B, Q, G, Y, E, a, b, c, d, R₃, R₄ e Z são definidos como na fórmula I.

Grupos sub-genéricos adicionais de compostos de fórmula I são representados pelas seguintes fórmulas IV, V e VI:

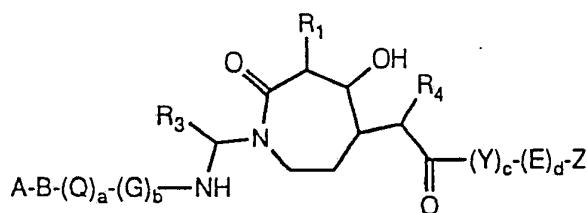


na qual R_2 é =0; e R_1 , A, B, Q, G, Y, E, d, R_3 , R_4 e Z são definidos como na Fórmula I;



Fórmula (V)

na qual R_2 é $2H$ ou $=0$; e R_1 , A , B , Q , G , Y , E , a , b , c , d , R_3 , R_4 e Z são definidos como na Fórmula I; e



Fórmula (VI)

na qual R_1 , A , B , Q , G , Y , E , a , b , c , d , R_3 , R_4 e Z são definidos como na Fórmula I.

São aqui utilizadas as abreviaturas e símbolos comumente usadas na arte dos péptidos:

<u>Aminoácido</u> <u>(Resíduo)</u>	<u>Código</u>	<u>Aminoácido</u> <u>(Resíduo)</u>
Alanina	Ala	
	Leu	Leucina
Arginina	Arg	
	Lys	Lisina
Asparagina	Asn	
	Met	Metionina
Ácido Aspártico	Asp	
	Phe	Fenilalanina
Cisteína	Cys	
	Pro	Prolina
Glutamina	Gln	
	Ser	Serina
Ácido Glutâmico	Glu	
	Thr	Treonina
Glicina	Gly	
	Trp	Triptofano



Aminoácido <u>(Resíduo)</u>	<u>Código</u>	Aminoácido <u>(Resíduo)</u>
Histidina	His	
	Tyr	Tirosina
Isoleucina	Ile	
	Val	Valina

Asparagina ou ácido Aspártico

Asx

Glutamina ou ácido Glutâmico

Glx

De acordo com a representação convencional, a extremidade amino está à esquerda e a extremidade carboxi está à direita. A menos que especificado em contrário, assume-se que todos os aminoácidos quirais possuem a configuração absoluta L. β -Ala refere-se ao ácido 3-aminopropanóico, Bzl refere-se a benzilo, Cbz refere-se ao radical carbobenziloxi, DCC refere-se à diciclo-hexilcarbodiimida, DMAP refere-se à N,N-dimetilaminopiridina, HOBT refere-se ao 1-hidroxi-benzotriazolo, NMM é a N-metilmorfolina, DMA é a dimetilacetamida, DMF é a dimetilformamida, THF é o tetra-hidrofurano e TFA refere-se ao ácido trifluoroacético. Também, BnOH ou Bzl-OH é álcool benzílico, TBDMS-Cl é cloreto de t-butildimethylsílico, DPPA é difenilfosforilazida. Quando aqui utilizados nos compostos deste invento, Asp e Glu, os quais possuem cadeias laterais de ácido carboxílico, abrangem ácidos carboxílicos livres, alquilo C₁₋₅ e cadeias laterais de éster benzílico. Alquilo pretende incluir qualquer grupo alquilo de cadeia linear ou ramificada com o número indicado de carbonos.

Os mimetistas de péptidos deste invento ligam-se à protease do HIV de uma maneira que mimetiza a ligação do substrato natural. O número total de resíduos de péptidos em B, Q, G, Y e E é geralmente de 3 a 5. Os resíduos mais próximos do local de clivagem putativo do mimetista de péptido são mais importantes para a ligação. O resíduo correspondente a G pode ser um aminoácido neutro, ácido ou básico. São adequados Glu, Gln, Arg, Lys, Ser, Ala, β -Ala, Asn, e Gly. Gln, Asn e Ala são

especialmente preferidos para G. O resíduo Q é preferivelmente um resíduo hidrofílico, tal como D- ou L- Ser, Thr, Asp ou His. São especialmente preferidos o Thr e Ser.

B corresponde a um aminoácido, o qual pode ser hidrofílico ou hidrofóbico, ou pode ser uma ligação covalente nos péptidos mais curtos. A identidade de B não é crítica e pode-se escolher um resíduo de modo a conferir as propriedades físico-químicas e bioquímicas favoráveis a todo o péptido, tal como a solubilidade em água e a resistência a exopeptidases. A escolha de um aminoácido D confere por vezes resistência a exopeptidases quando o aminoácido D está na extremidade do péptido. Quando B é uma ligação covalente, pode ser vantajoso que Q seja um D-aminoácido. Quando B não é uma ligação covalente, B é preferivelmente um aminoácido D ou L escolhido entre Ala, β -Ala, Gly, Ile, Val, Leu, Met, His, Lys, Arg, Glx, Asx, Cys, Ser ou Thr. Para a produção dos péptidos mais pequenos deste invento que se ligam à protease retroviral, B é preferivelmente uma ligação covalente.

Y e E podem corresponder ao mesmo aminoácido ou a aminoácidos diferentes ou a uma ligação covalente. Se Y e/ou E forem aminoácidos, eles podem ser hidrofílicos ou hidrofóbicos. Da mesma maneira que B, os resíduos de Y e E podem ser usados para conferir propriedades bioquímicas ou físico-químicas favoráveis ao composto. Portanto, podem-se utilizar os resíduos hidrofílicos para conferir propriedades de solubilidade desejadas ou podem-se utilizar D-aminoácidos no terminal carboxilo para conferir resistência a exopeptidases. Preferivelmente, pelo menos um de Y e E é um aminoácido seleccionado de entre Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Val, Arg, Lys, Thr, Ser, Cys, Glx ou Asx. Para os compostos de cadeia mais curta deste invento, Y e E podem estar ausentes, mas é especialmente adequado que sejam um ou dois aminoácidos. São preferidos o Ala, Gly, Ile, Met, Arg, Asx e Val. A valina é especialmente preferida.

Os compostos do presente invento podem possuir centros assimétricos, por exemplo, na posição 3 (R_1) do anel da fórmula I, ou na posição 2 (OH) do anel, em compostos tais como os de fórmula

~~CONFIDENTIAL~~

III anterior, ou na cadeia lateral $(CHCR_4)C(=O)-(Y)_c-(E)_d-Z$, ou na cadeia lateral $A-B-(Q)_a-(G)_b-(NHCHR_3)-$. A síntese aqui descrita para a preparação dos compostos deste invento pode produzir misturas de diastereómeros. Podem-se separar os isómeros por procedimentos padrão tais como por cromatografia. Todos os isómeros dos compostos de fórmula I, tanto em misturas racémicas como na forma de diastereómeros individuais, estão incluídos na fórmula I e estão dentro do âmbito deste invento.

Quando se administram compostos deste invento a um animal infectado ou potencialmente infectado com o vírus HIV o qual depende de uma protease codificada viralmente para o processamento de poliproteínas virais, a replicação viral do HIV é inibida e portanto, a progressão da doença é retardada.

Os compostos seguintes estão incluídos, mas de modo algum limitam o âmbito deste invento:

- 1) éster metílico de 2-[2-oxo-3-benzil-5-(1-alanilamino-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina;
- 2) éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-alanilamino-etyl)2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina;
- 3) éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-fenilalanil)amino-etyl]-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina;
- 4) éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-(alanil-alanil)amino-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina;
- 5) éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-alanilamino-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valina;
- 6) éster metílico de 2-(2-hidroxi-3-benzil-5-metil-ciclo-hept-4-en-1-il)-1-oxo-etyl-valinil-valina;
- 7) éster metílico do 2-(2-hidroxi-3-benzil-5-metil-ciclo-hept-5-en-1-il)-1-oxo-etyl-valinil-valina;
- 8) éster metílico de 2-(2-hidroxi-3-benzil-5-t-butil-ciclo-hept-4-en-1-il)-1-oxo-etyl-valinil-valina;
- 9) éster metílico do 2-(2-hidroxi-3-(4-imidazolil)metil-

- 5-metil-ciclo-hept-4-en-1-il)-1-oxo-etil-valinil-valina;
- 10) éster metílico de 2-(5-[(1S)-1-alanilamino-etil]-3-benzil-2-hidroxi-ciclo-hept-4-en-1-il)-1-oxo-etil-valinil-valina;
- 11) 2-(5,7-dioxo-6-benzil-4-[(1R)-1-(benziloxicarbonilalanil)-amino-etil]-2,3,4,5,6,7-hexa-hidro-1H,4H-1,4-diazepin-1-il)-propanoato de (2S)-t-butilo;
- 12) éster metílico de (2R)-2-(1-[(1R)-1-(N-t-butiloxicarbonilalanil)amino-etil]-3-benzil-4-hidroxi-2,3,4,5,6,7-hexa-hidro-1H-azepin-5-il)-1-oxo-propil-valinil-valina; e
- 13) éster metílico de (2S)-2-(2,3,4,5,6,7-hexa-hidro-1H,4H-3-benzil-4-[(1R)-1-(benziloxicarbonil-alanilamino)-etil]-5-oxo-6-benzil-1,4-diazepin-1-il)-3-fenil-1-oxo-propil-valinil-valina.

Os compostos de azepina de fórmula I, onde V é N, são preparados por ciclização de um éster amino-hex-3-enóico substituído na posição 6, depois por tratamento com os reagentes apropriados para adicionar os substituintes desejados ao anel e para adicionar resíduos de aminoácido aos grupos amino e carbonilo nos substituintes de V e W do anel. Os esquemas 1 e 2 referem-se a procedimentos para a preparação de compostos azepin-2-ona e tetra-hidroazepina deste invento, em particular, dos compostos dos exemplos 1 e 2.

Os esquemas 3 e 4 esboçam procedimentos para compostos de fórmula I onde R₂ é hidróxi e V e W são C.

O esquema 5 refere-se a um procedimento para a preparação de compostos de diamida de fórmula I onde V e W são N, e R e R₂ são =0.

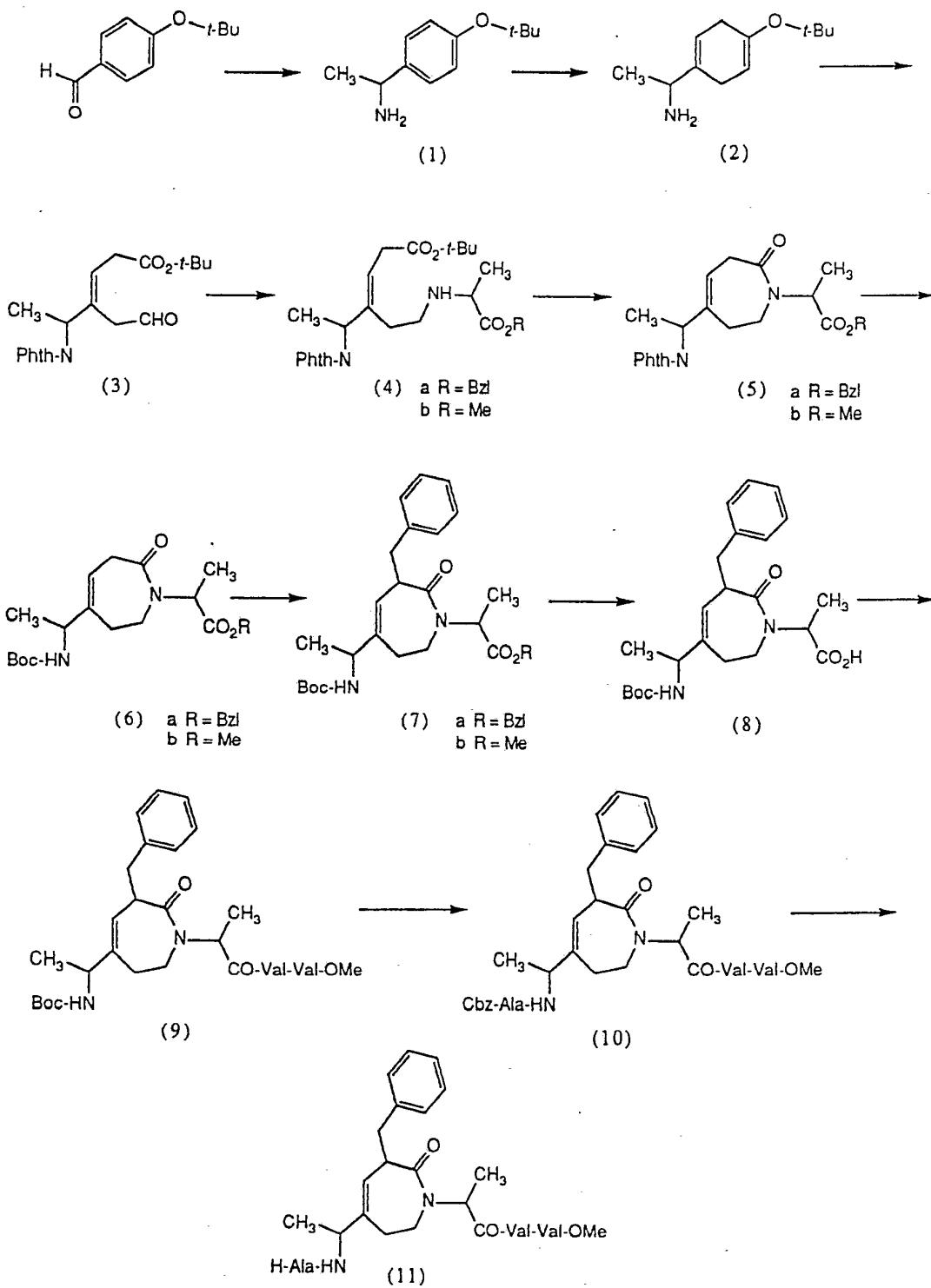
No esquema 6, esboça-se um procedimento para compostos de fórmula I onde V é C, W é N, R é =0 e R₂ é OH.

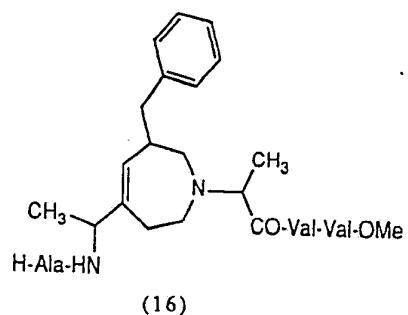
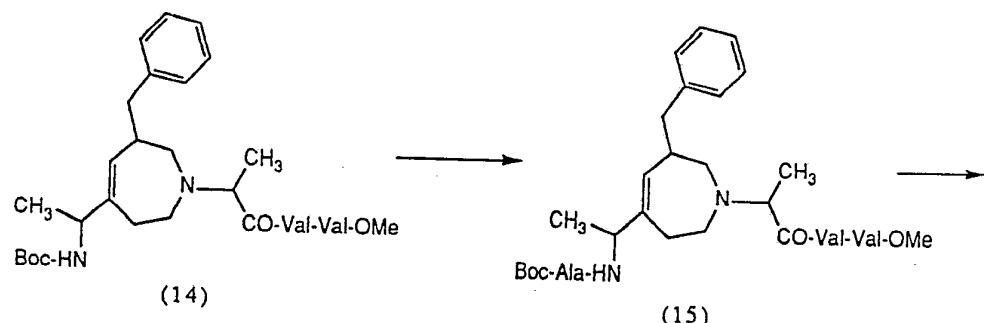
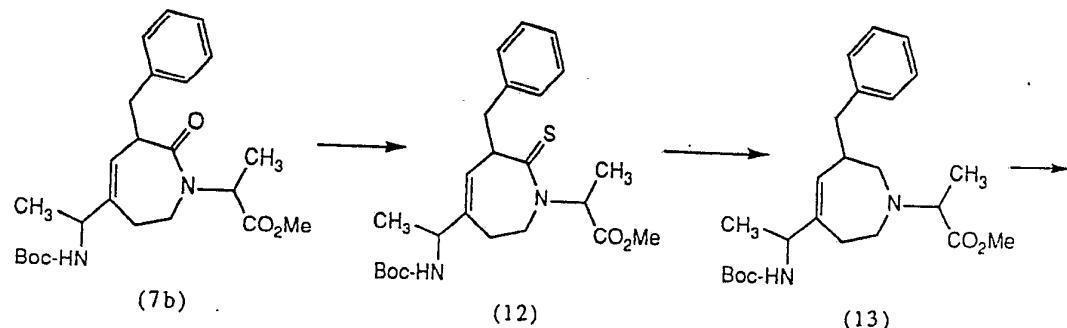
O esquema 7 refere-se a um procedimento para compostos de fórmula I onde V e W são N, R é =0 e R₂ é 2H.

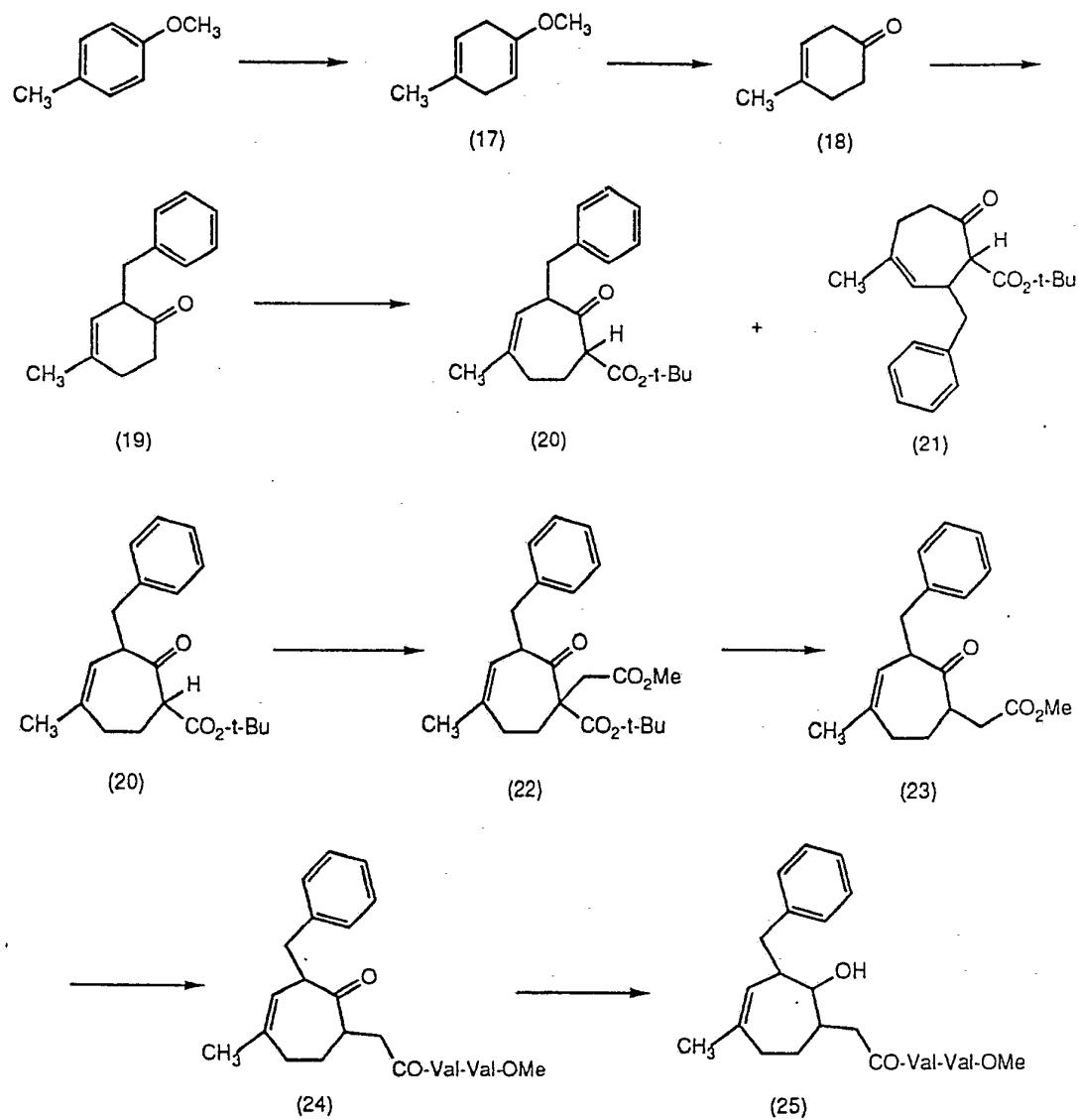
Preparam-se outros compostos do invento por ciclização ou

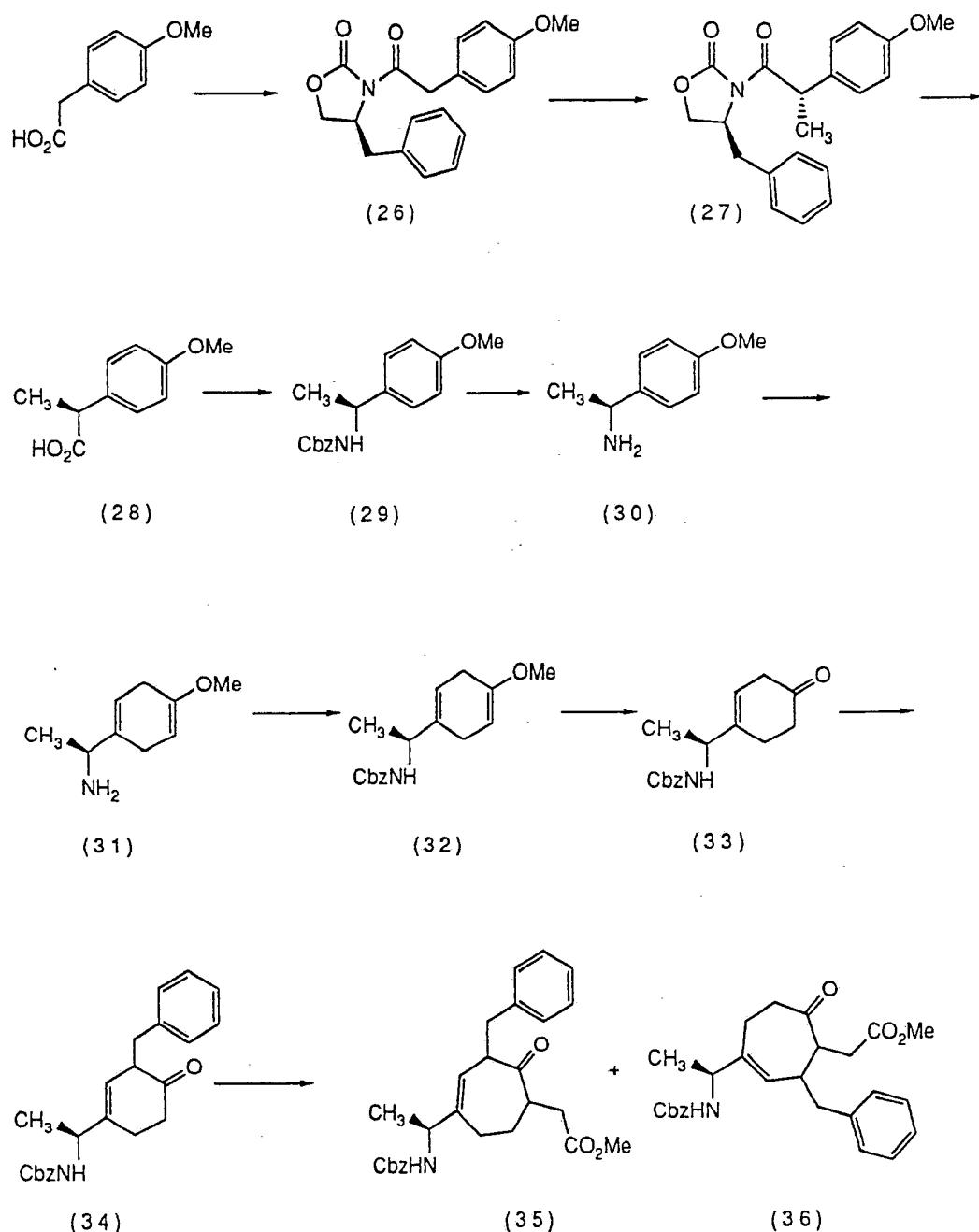
expansão de anel, para preparar o anel de sete membros e depois por adição de substituintes e, em particular, adicionando opcionalmente, resíduos de aminoácido nas posições 1- e 5- do anel, como esboçado no esquema 8. Estes processos são também um objetivo deste invento.

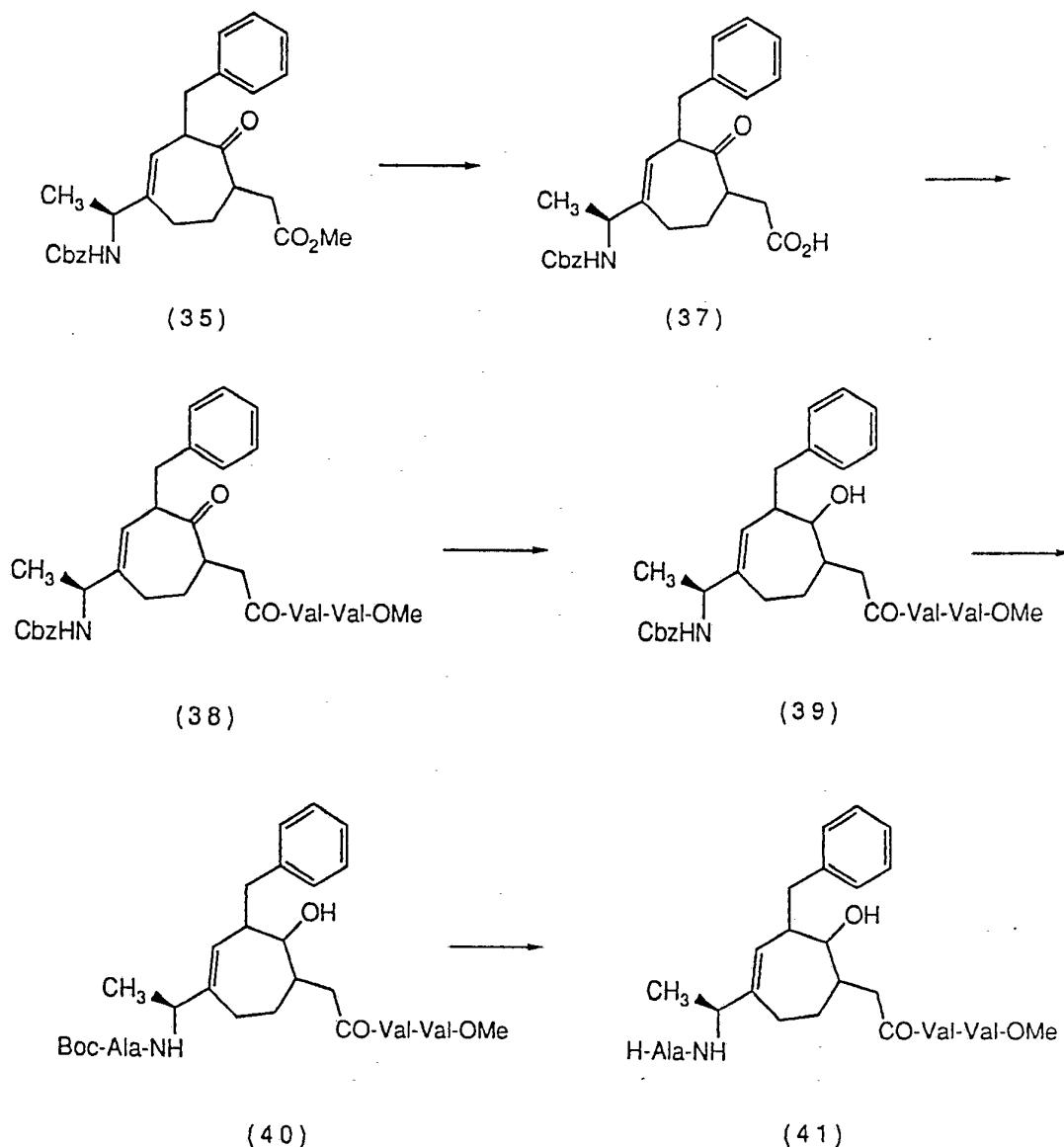
Esquema 1

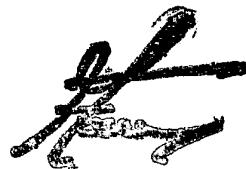


Esquema 2

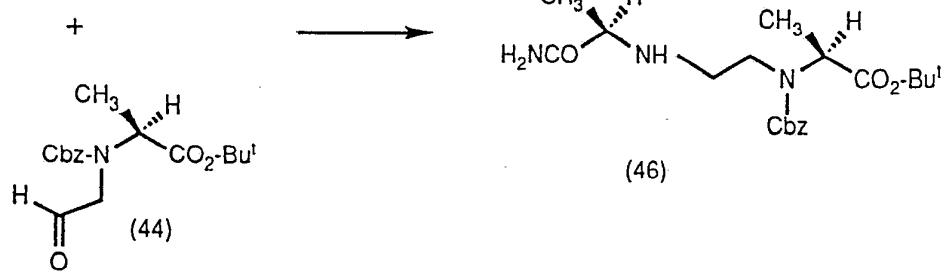
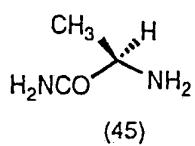
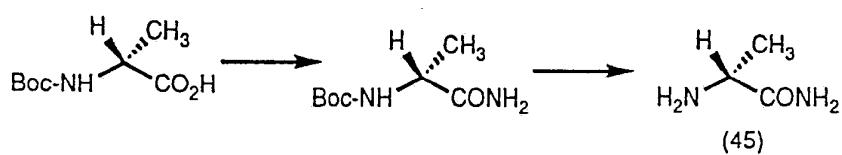
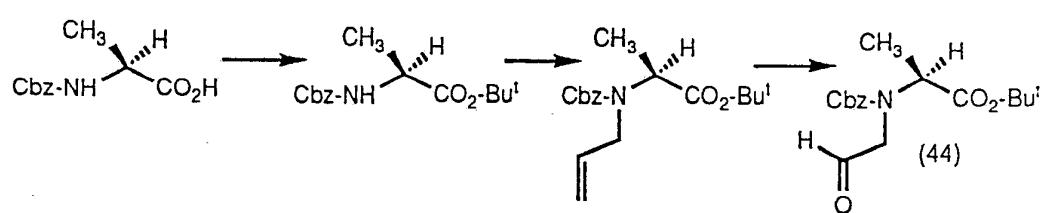
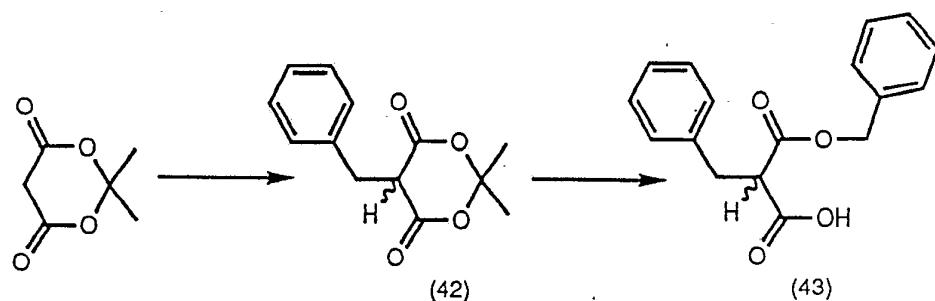
Esquema 3

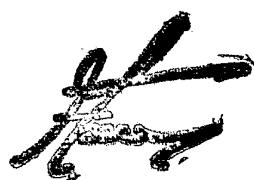
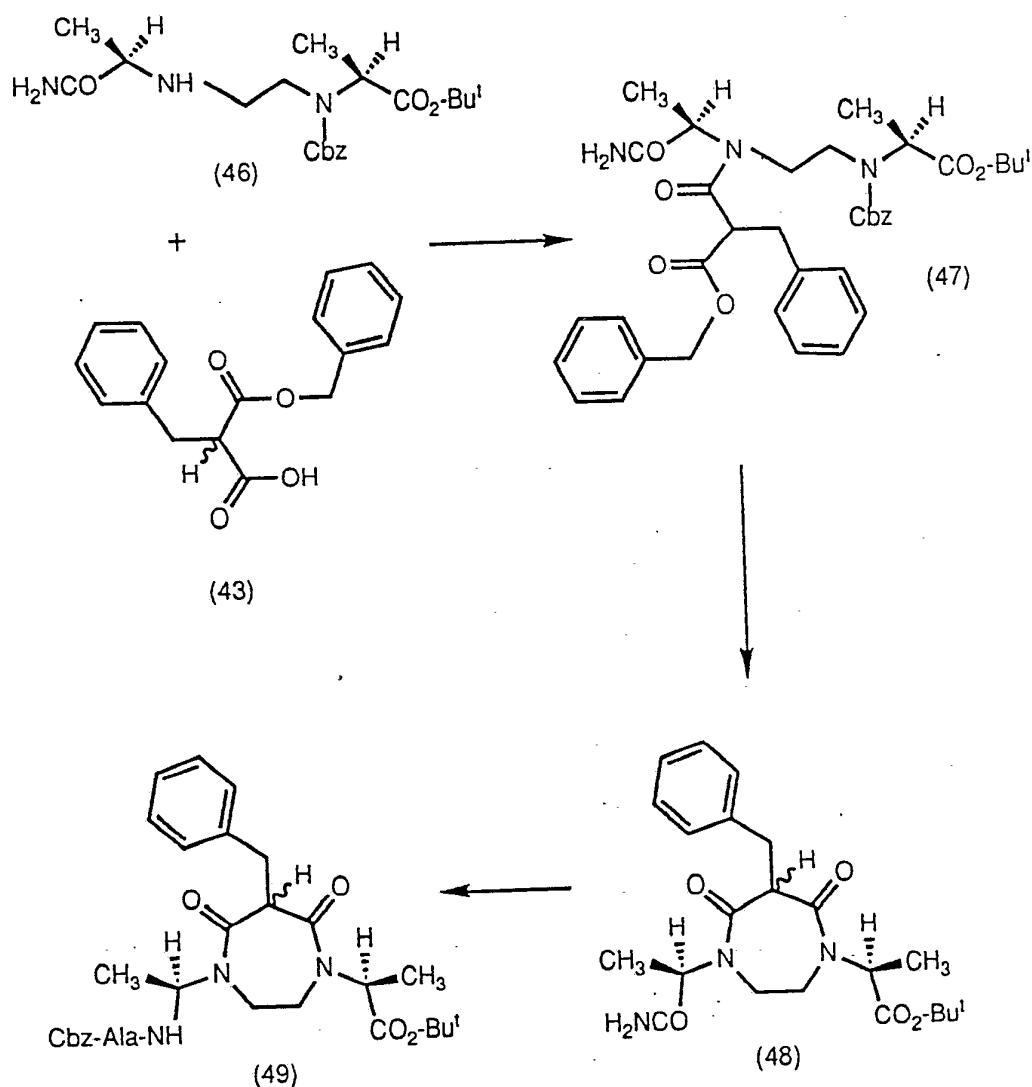
Esquema 4

Esquema 4 (cont.)

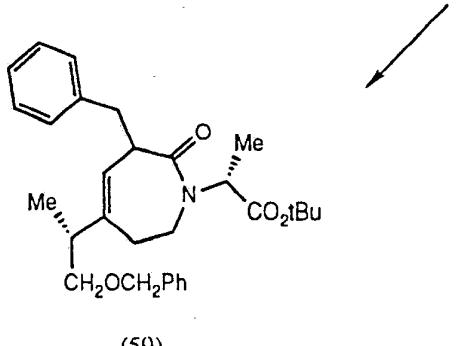
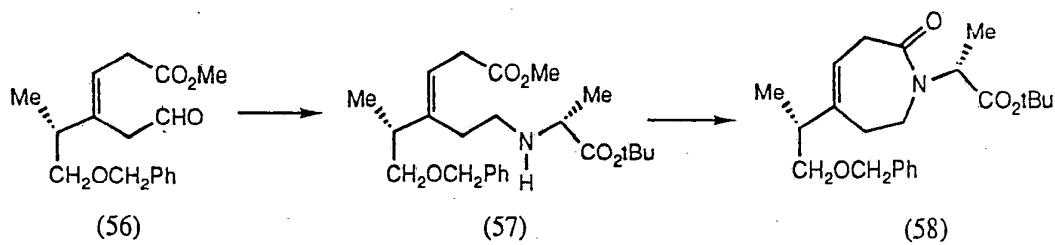
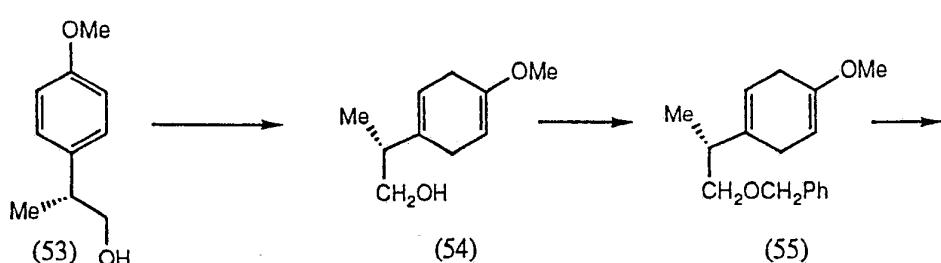
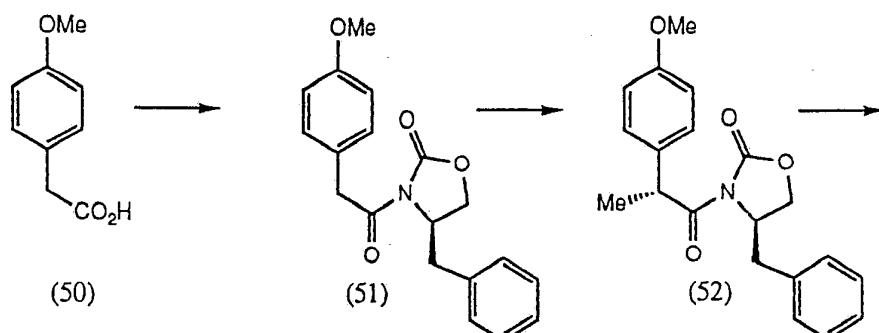


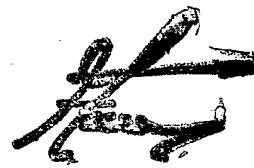
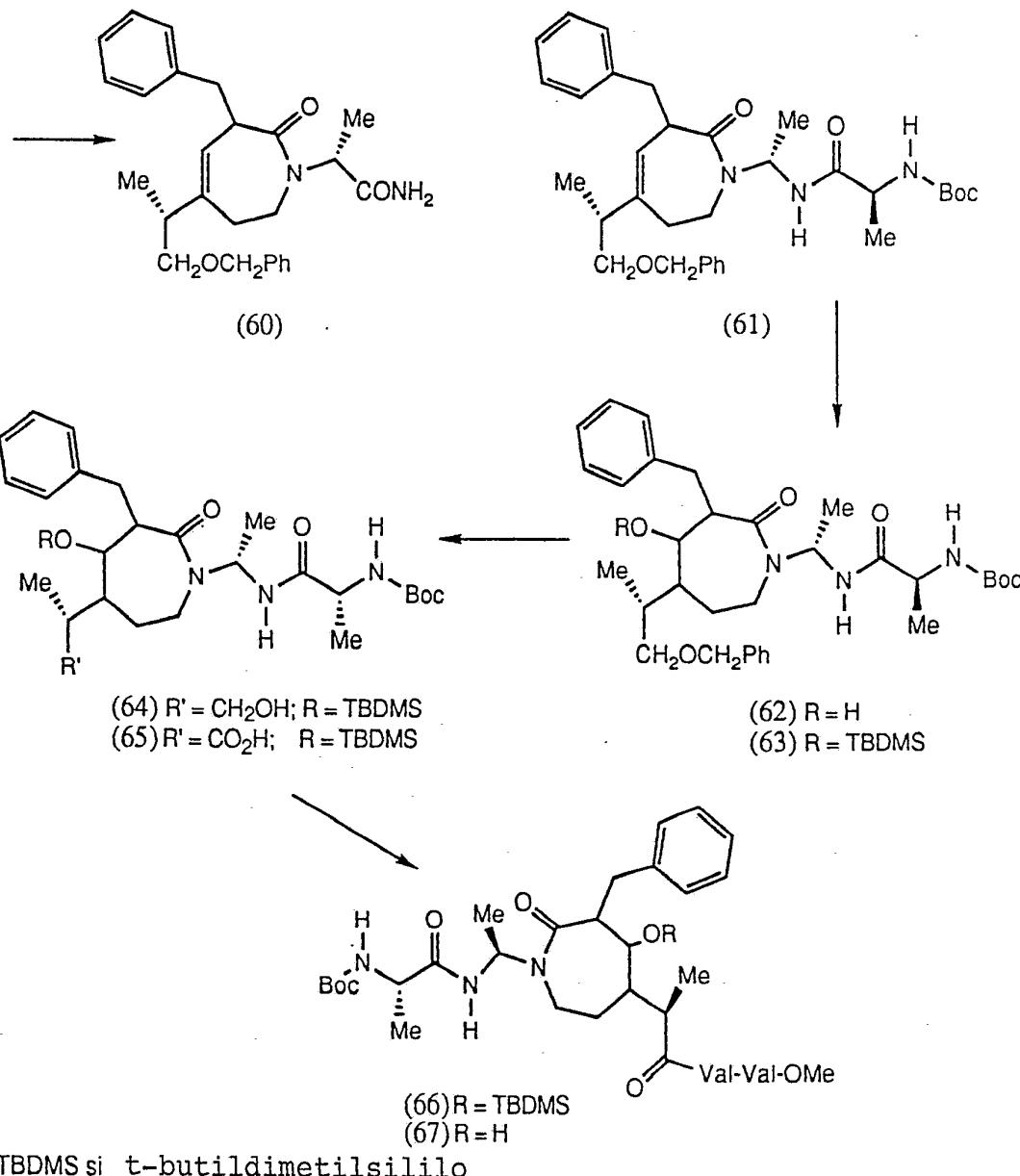
Esquema 5

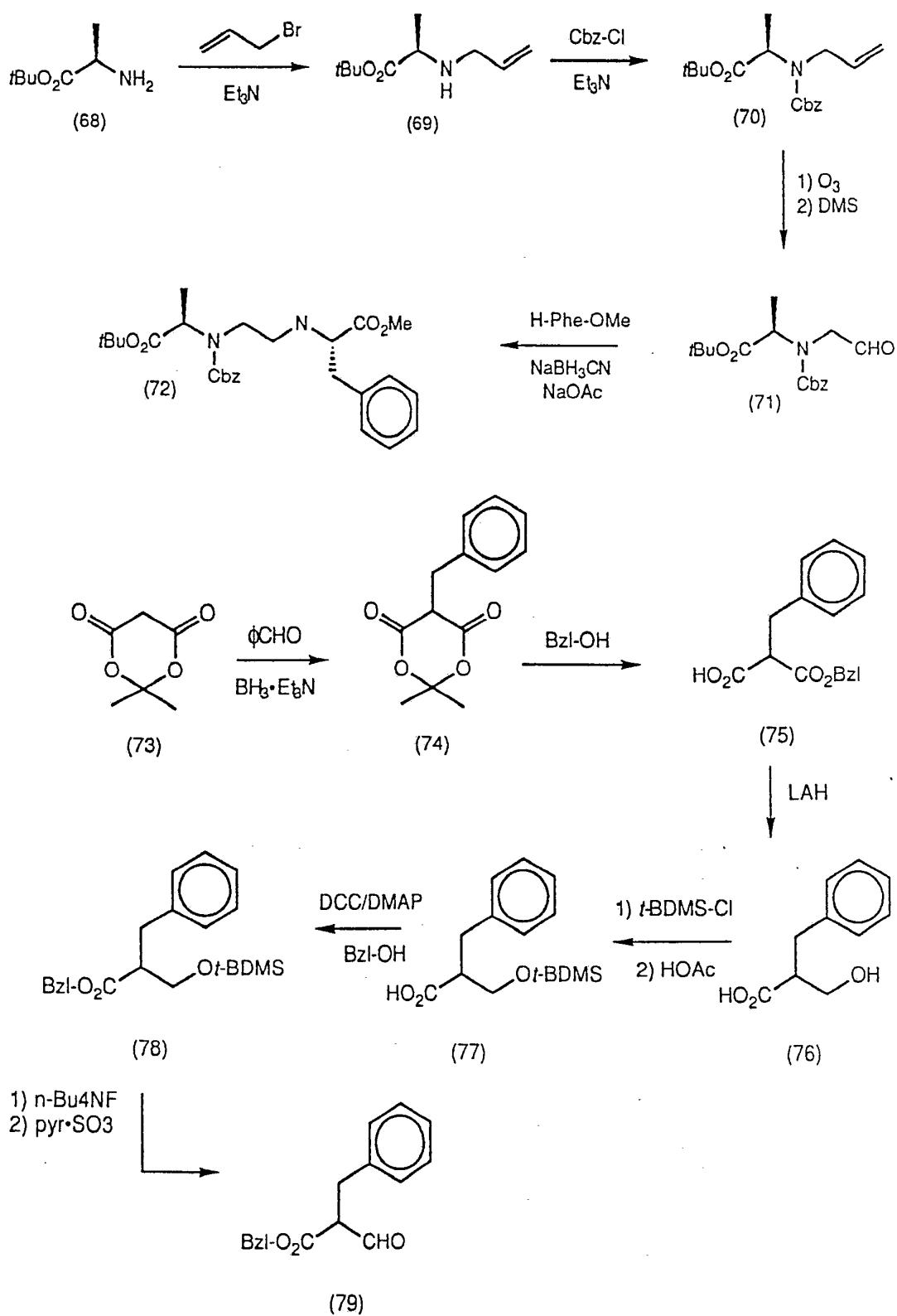


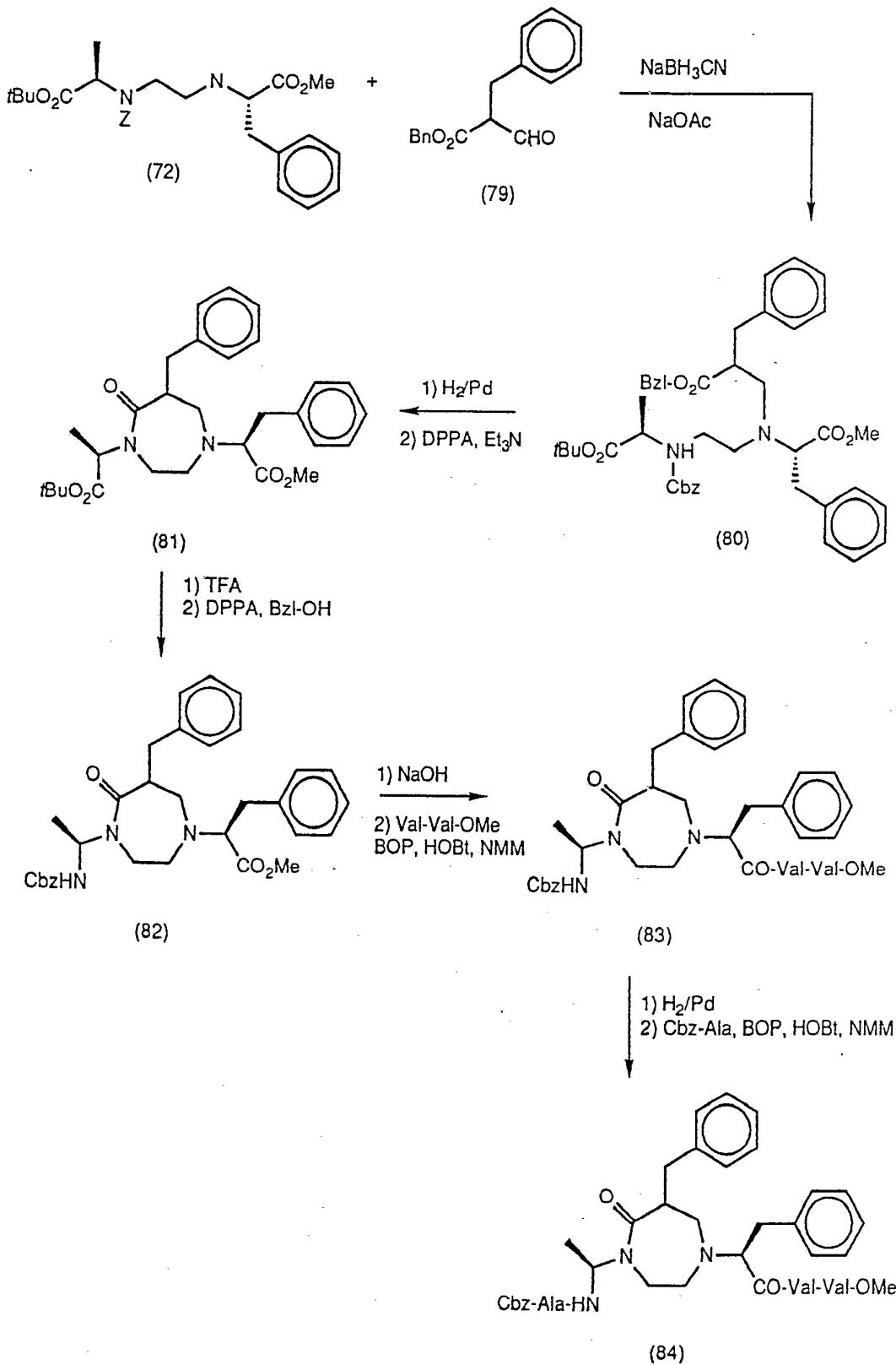
Esquema 5 (cont.)

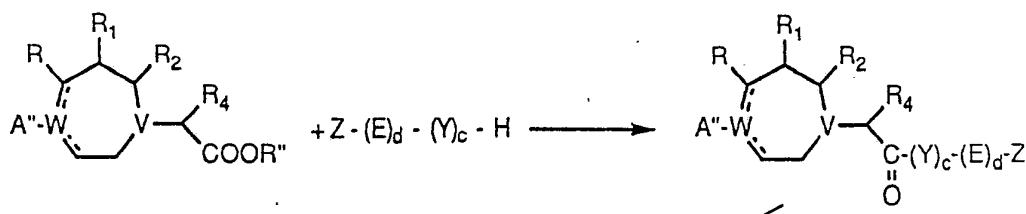
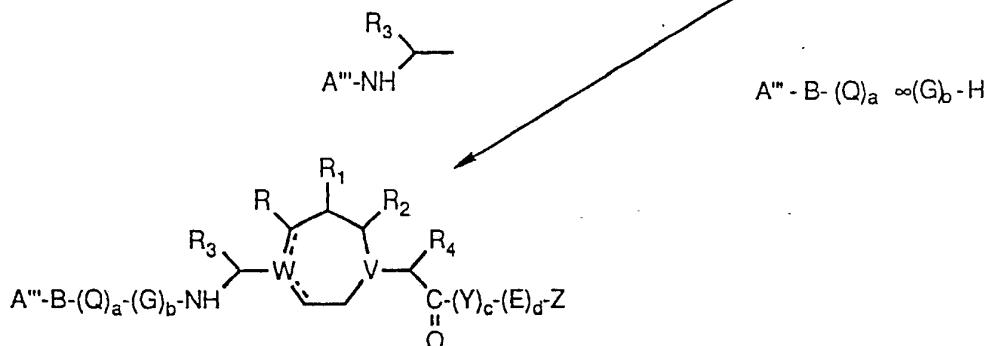
-20-

Esquema 6

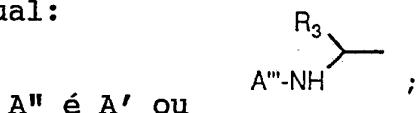
Esquema 6 (cont.)

Esquema 7

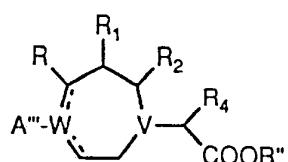
Esquema 7 (cont.)

Esquema 8quando A'' é

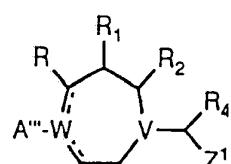
no qual:

 A'' é A' ou R'' é hidrogénio ou alquilo inferior;

A'' é H ou grupo protector de amino; e os outros termos são como na fórmula I; e removendo, opcionalmente, o grupo protector A'' ; ou convertendo um composto de fórmula:

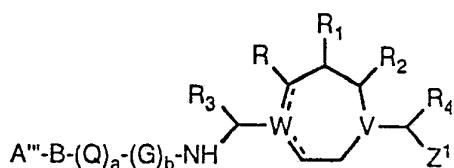


no composto seguinte de fórmula:

na qual Z' é Z com quaisquer grupos protectores necessários, e

quando A'' é

fazendo-o reagir com $A''-B-(Q)_a-(G)_b-H$ para dar um compostos de fórmula:



e removendo, opcionalmente, o grupo protector A'' e quaisquer grupos protectores em Z' .

As propriedades inibidoras de proteases dos compostos deste invento são postas em evidência pela sua capacidade para inibir a hidrólise de um substrato peptídico pela protease do HIVr. Os dados na tabela seguinte são representativos da inibição produzida por estes compostos.

TABELA I

<u>Compostos do</u> <u>Exemplo nº</u>	<u>Inibição da protease</u> <u>do HIVr</u>
1	100 μM
2	0,6 μM
3	3,6 μM

As composições farmacêuticas dos compostos deste invento, ou seus derivados, podem ser formuladas como soluções ou pós liofilizados para administração parentérica. Os pós podem ser reconstituídos por adição de um diluente adequado ou de outro transportador farmaceuticamente aceitável antes de se utilizar. A formulação líquida é geralmente uma solução aquosa isotónica, tamponada. Os exemplos de diluentes adequados são a solução salina isotónica normal, solução padrão de dextrose a 5% em água ou solução de acetato de sódio ou de amónio tamponada. Esta formulação é especialmente adequada para administração parentérica, mas também se pode utilizar para administração oral ou contida num inalador de dose medida ou nebulizador para insuflação. Pode ser desejável adicionar excipientes tais como polivinilpirrolidona,

gelatina, hidroxicelulose, acácia, polietilenoglicol, manitol, cloreto de sódio ou citrato de sódio.

Uma composição preferida para administração parentérica pode ser constituída, adicionalmente, por uma quantidade do composto encapsulado num transportador lipossómico. Pode-se formar o liposoma por dispersão dos compostos numa fase aquosa com fosfolípidos, com ou sem colesterol, utilizando uma variedade de técnicas, incluindo mistura manual convencional, extrusão a pressão elevada, evaporação em fase inversa e micro-fluidização. Este transportador pode ser dirigido, opcionalmente, para o seu local de accção por uma imunoglobulina ou proteína reactiva com a partícula viral ou com as células infectadas. Um exemplo de uma destas proteínas é a glicoproteína CD-4 da célula T, ou um seu derivado, tal como a CD-4s (CD-4 solúvel), a qual é reactiva com a proteína do revestimento de glicoproteínas do vírus de imunodeficiência humana (HIV).

Alternativamente, estes compostos podem ser capsulados, transformados em comprimidos ou preparados numa emulsão ou xarope para administração oral. Podem-se adicionar transportadores sólidos ou líquidos farmaceuticamente aceitáveis, para aumentar ou estabilizar a composição, ou para facilitar a preparação da composição. Os transportadores líquidos incluem xarope, óleo de amendoim, azeite, glicerina, solução salina e água. Os transportadores sólidos incluem amido, lactose, di-hidrato de sulfato de cálcio, terra alba, estearato de magnésio ou ácido esteárico, talco, pectina, acácia, agar ou gelatina. O transportador pode também incluir um material de libertação sustida tal como o monoestearato de glicerilo ou o di-estearato de glicerilo, sozinhos ou com uma cera. A quantidade de transportador sólido varia mas, preferivelmente, estará entre cerca de 20 mg e cerca de 1 g por unidade de dosagem. As preparações farmacêuticas são preparadas seguindo as técnicas convencionais de farmácia, envolvendo moagem, mistura, granulação, e compressão, quando necessário, para as formas de comprimido; ou moagem, mistura e enchimento para formas de cápsula de gelatina dura. Quando se utiliza um transportador líquido, a pre-



paração estará na forma de um xarope, elixir, emulsão ou suspensão aquosa ou não aquosa. Este tipo de formulações líquidas pode ser administrado directamente p.o. ou introduzido numa cápsula de gelatina mole.

Para administração rectal, pode-se combinar um pó pulverizado dos compostos deste invento com excipientes tais como manteiga de cacau, glicerina, gelatina ou polietilenoglicóis, e moldar num supositório. Podem-se também combinar os pós pulverizados com uma preparação oleosa, um gel, creme ou emulsão, tamponado ou não tamponado, e administrar através de um penso transdérmico.

1 Adequadamente, uma composição farmacêutica compreende um composto deste invento, azidotimidina e um transportador farmacuticamente aceitável.

Utilizam-se os compostos de fórmula I para induzir actividade anti-HIV em pacientes que estejam injectados com o vírus e que necessitem deste tratamento. O processo de tratamento compreende a administração, oralmente, parentericamente, bucalmente, transdermicamente, rectalmente ou por insuflação, de uma quantidade eficaz do composto escolhido, preferivelmente disperso num transportador farmacêutico. As unidades de dosagem do ingrediente activo são seleccionadas da gama de 0,05 a 15 mg/kg. Podem-se administrar estas unidades de dosagem de uma a dez vezes por dia para infecção aguda ou crónica.

Os exemplos que se seguem servem para ilustrar este invento. Não se pretende que os exemplos limitem de modo algum o âmbito deste invento, mas são proporcionados para mostrar a preparação e utilização dos compostos deste invento.

Nos exemplos, todas as temperaturas estão em graus Celsius. As análises de aminoácidos foram realizadas um Dionex Autoion 100. A análise do teor em péptidos é baseada na análise de aminoácidos. Os espectros de massa FAB foram realizados num espectrómetro de massa VG Zab utilizando um bombardeamento de átomos rápidos. A RMN foi registada a 250 MHz utilizando um es-

pectrómetro Bruker AM250 ou a 90 MHz utilizando um espetrómetro Varian EM 390. As multiplicidades indicadas são: s = singuleto, d = duploeto, t = triploeto, q = quarteto, m = multipleto e largo indicam um sinal largo. Todos os espetros usaram tetrametilsilano como padrão interno.

Inibição da actividade da protease de HIV

Um ensaio típico contém 10 ml de tampão MENDT (Mes 50 mM (pH 6,0; ácido 2-(N-morfolino)etanossulfónico), EDTA 1 mM, ditiotreitol 1 mM, NaCl 200 mM, Triton X100 a 0,1%); N-acetil-L-arginil-L-alanil-L-seril-L-glutaminil-L-asparaginil-L-tirosil-L-prolil-L-valil-L-valinamida (Ac-Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂; K_m = 7 mM) 2, 3 ou 6 mM; e concentrações micromolares ou sub-micromolares de compostos sintéticos. Após incubação a 37°C durante vários min, inicia-se a reacção com 0,01-1 mg de protease de HIV purificada. Param-se as reacções (37°C) após 10-20 min com um volume igual de ácido tricloroacético 0,6 N frio, e após centrifugação para remover o material precipitado, analisam-se os produtos da peptidólise por HPLC de fase reversa (Beckman Ultrasphere ODS, 4,5mmx25mm; fase móvel; acetonitrilo a 5-20%/H₂O-TFA a 0,1% (15 min), acetonitrilo a 20%/H₂O-TFA 0,1% (5 min) a 1,5 ml/min, detecção a 220 nm.). Confirmaram-se as posições de eluição do Ac-Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂ (17-18 min) e do Ac-Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Tyr (10-11 min) com o material autêntico. Determinaram-se as velocidades iniciais de formação do Ac-Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Tyr por integração destes picos, e tipicamente, determinaram-se as propriedades de inibição dos compostos sintéticos a partir da análise de declive/ordenada na origem de uma representação de 1/v vs [inibidor] (análise de Dixon). Os valores de K_i resultantes deste tipo de análise primária são precisos apenas para inibidores competitivos, e sob condições em que a constante de Michaelis do substrato usada está bem determinada.

Exemplo 1

Preparação do éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-alanilamino-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-2-oxo-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina (11)

Prepara-se o composto 11, do esquema 1 apresentado anteriormente, como segue:

a) 1-(4-t-butiloxifenil)-etilamina (1)

A uma solução agitada de p-t-butiloxibenzaldeído (45 g, 250 mmol) em THF seco (100 ml) sob Ar, a 0°C, adicionou-se uma solução de hexametildissilazano de lítio (280 ml, 1N em THF). Deixou-se a mistura reacional aquecer até à temperatura ambiente e agitou-se durante 15 min. Adicionou-se em seguida uma solução de brometo de metilmagnésio (170 ml, 3N em éter) e aqueceu-se a mistura reacional em refluxo, sob argon, durante dois dias. Verteu-se lentamente a mistura reacional em cloreto de amónio saturado frio (500 ml) com mistura rotativa, extractou-se com éter (2 x 300 ml), lavou-se com salmoura, secou-se sobre sulfato de sódio e evaporou-se até à secura. A destilação de caminho curto sob alto vácuo (p.e. 100°C, 0,667 Pa) produziu o produto na forma de um líquido límpido (32,3 g, 71%): CD TA 6,88 min (coluna de metilsilicone HP 530 μ x 20 m, caudal do transportador He 20 ml/min, temp. inic. 100°C, tempo inic. 3 min, velocidade 10°C/min, temp. final 180°C, tempo final 1 min); 1 H RMN (CDCl₃) δ 1,3 (3H, d, J=6Hz), 1,45 (2H, s), 4,05 (1H, q), 7,1 (4H, q).

b) 1-t-butiloxi-4-(1-amino-etyl)-1,4-ciclo-hexadieno (2)

Numa solução agitada da amina anterior (1) (32,3 g) e t-butanol (14,5 g) em THF seco (200 ml) a -78°C condensou-se NH₃ (1000 ml) por meio de um tubo frio. Adicionou-se então arame de lítio (3,3 g) em porções com agitação vigorosa. Agitou-se a mistura reacional, agora azul, durante 1 h a -78°C e então extinguiu-se lentamente com etanol até a mistura reacional ficar branca. Deixou-se a mistura reacional aquecer até à temperatura ambiente e aqueceu-se para permitir que o NH₃ evaporasse. Retomou-se a pasta em éter, lavou-se com água, secou-se sobre sulfato de sódio e evaporou-se para dar o produto na forma dum líquido límpido (32,6 g, pureza >95%): CD TA 7,26 min (coluna de

metilsilicone HP 530 $\text{m}\mu$ x 20 m, caudal do transportador He 20 ml/min, temp. inic. 100°C, temp. inici. 3 min, velocidade 10°C/min, temp. final 180°C, tempo final 1 min); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ 1,1 (3H, d, $J=6\text{Hz}$), 1,3 (9H, s), 1,4 (2H, s), 3,45 (1H, q), 5,1 (1H, s), 5,6 (1H, s).

c) 4-(1-ftalilaminoetil)-6-oxo-(Z)-hex-3-enoato de t-butilo (3)

A uma solução agitada do dieno anterior (2) (32,6 g) em THF (300 ml) adicionou-se N-etoxicarbonilftalimida (36,6 g). Após 2 h adicionou-se NET_3 (24 ml) e agitou-se a mistura reaccional durante a noite à temperatura ambiente. A TLC indicou que a reacção estava completa. TLC R_f 0,71 (sílica gel, EtOAc a 30%, n-hexano). Evaporou-se a mistura reaccional até à secura e re-evaporou-se várias vezes com tolueno para remover qualquer excesso de NET_3 . Retomou-se o dieno ftalado, bruto, em metanol, CH_2Cl_2 (3:1) (500 ml) e com agitação a -78°C, fez-se passar O_3 através da mistura reaccional até a maior parte do dieno ter desaparecido por TLC. Arejou-se então a mistura reaccional com Ar para remover o excesso de O_3 e adicionou-se dimetilsulfito (30 ml). Deixou-se a mistura reaccional aquecer até à temperatura ambiente e agitou-se durante 3 h. Após evaporação do solvente, obteve-se o produto (3) na forma de um óleo por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com 20% de acetato de etilo em n-hexano (23,4 g, 39%): TLC R_f 0,49 (sílica, EtOAc a 30% n-hexano); $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ 1,5 (9H, s), 1,7 (3H, d, $J=7\text{Hz}$), 3,05 (2H, d, $J=7\text{Hz}$), 3,3 (2H, s), 5,05 (1H, q), 6,2 (1H, t), 7,85 (4H, m), 9,65 (1H, t).

d) Éster benzílico de N-[5-t-butiloxicarbonil-3-(1-ftalilamino-etyl)-(Z)-pent-3-enil]-alanina (4a)

A uma solução agitada do aldeído anterior (3) (12,5 g) em metanol (200 ml) sob Ar adicionou-se sal do ácido p-toluenosulfónico do éster benzílico de L-alanina (25 g), NET_3 (4,9 ml), e NaBH_3CN (4,4 g), em porções, durante 5 min. Agitou-se a mistura reaccional durante 16 h, evaporou-se até à secura, retomou-se em acetato de etilo, lavou-se com água, secou-se sobre Na_2SO_4 e re-evaporou-se. Obteve-se o produto na forma de uma mistura de diastereómeros, por cromatografia flash sob sílica gel eluída com

EtOAc a 30-40% em n-hexano. (3,77 g, 21%): TLC R_f 0,24 (sílica, 40% de EtOAc, n-hexano); 1H RMN ($CDCl_3$) δ 1,2 (3H, d, $J=6Hz$), 1,45 (9H, s), 1,65 (3H, d, $J=7Hz$), 1,7-2,2 (5H, m), 3,1 (2H, d, $J=6Hz$), 3,35 (1H, q), 4,9 (1H, q), 5,15 (2H, s), 5,9 (1H, m), 7,4 (5H, s), 7,8 (4H, m).

e) 1-(1-benziloxicarboniletíl)-5-(1-ftalilaminoetíl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-2-ona (5a)

Ao diéster anterior (4a) (3,77 g) adicionou-se 80% de TFA em CH_2Cl_2 (75 ml). Após agitação durante 1 h à temperatura ambiente, evaporou-se a mistura reacional até à secura e re-evaporou-se em tolueno várias vezes para remover quaisquer quantidades vestigiais de TFA. A uma solução agitada do produto anterior em DMF (300 ml) a 0°C sob Ar, adicionou-se NET_3 (2 ml), $NaHCO_3$ (3 g) e difenilfosforilazida (3,12 ml). Agitou-se a mistura reacional sob Ar a 0°C durante 2 dias. Após remoção do solvente por destilação, retomou-se o resíduo em acetato de etilo, lavou-se com água, secou-se sobre $MgSO_4$, evaporou-se e purificou-se por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com EtOAc a 45-50% em n-hexano produzindo o produto, uma mistura de diastereómeros, na forma de um óleo (1,95 g, 60%): TLC R_f 0,32 (sílica, EtOAc a 50%, n-hexano); 1H RMN ($CDCl_3$) δ 1,43 (3H, dd), 1,6 (3H, d, $J=7Hz$), 2,25 (2H, s largo), 3,2-3,8 (4H, m), 4,75 (1H, q), 5,15 (2H, s), 5,2 (1H, q), 5,85 (1H, t), 7,35 (5H, s), 7,75 (4H, m).

f) 1-(1-benziloxicarboniletíl)-5-(1-t-butiloxicarbonilaminoetíl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-2-ona (6a)

A uma solução agitada do composto anterior (5a) (1,95 g) em etanol (60 ml) adicionou-se mono-hidrato de hidrazina (0,5 ml). Agitou-se a mistura reacional durante 3 dias à temperatura ambiente. Removeu-se, por destilação, o solvente à suspensão branca resultante, tritou-se com clorofórmio (100 ml) e filtrou-se para remover qualquer material insolúvel. Após enxaguamento com clorofórmio fresco (10 ml), evaporou-se o filtrado até à secura. Retomou-se o óleo que ficou em THF (75 ml) e adicionou-se dicarbonato de di-t-butilo (1,9 g) com agitação. Agitou-se a mistura reacional durante 16 h à temperatura ambiente e evaporou-se até à secura. Purificou-se o produto, uma mistura de

diastereómeros, por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com EtOAc a 40-50% em n-hexano. (1,14 g, 62%): TLC R_f 0,25 (sílica, EtOAc a 40%, n-hexano); 1H RMN ($CDCl_3$) δ 1,15 (3H, d, $J=6Hz$), 1,45 (9H, s), 1,5 (3H, d, $J=6Hz$), 2,3 (2H, s largo), 3,2-3,8 (4H, m), 4,05 (1H, q), 4,7 (1H, d, $J=9Hz$), 5,2 (2H, s), 5,6 (1H, t), 7,4 (5H, s).

g) 1-(1-benziloxicarboniletíl)-3-benzil-5-(1-t-butiloxicarbonilaminoetyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-2-ona (7a)

A uma solução agitada de diisopropilamina de lítio preparada a partir de diisopropilamina (1 ml) em THF (100 ml) e butil-lítio (2,6 ml, butil-lítio 2,5 N em hexano), adicionou-se a -78°C sobre Ar, o éster Boc-benzílico anterior (6a) (1,1 g) dissolvido em THF (20 ml). Após agitação durante 15 min a -78°C, adicionou-se brometo de benzilo (0,63 ml) numa só porção. Agitou-se a mistura reaccional durante 30 min e extinguíu-se a reacção com NH_4Cl sat. Após aquecimento até à temperatura ambiente extractou-se a mistura reaccional com EtOAc, lavou-se com salmoura, secou-se sobre $MgSO_4$ e evaporou-se. Obteve-se o produto, na forma de uma mistura de diastereómeros, por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com EtOAc a 20-50% em n-hexano. (0,23 g). Recuperou-se também o material de partida que não reagiu (0,78 g) que foi realquilado como anteriormente para dar um total de 0,5 g de produto. TLC R_f 0,60 (sílica, EtOAc a 40%, n-hexano); 1H RMN ($CDCl_3$) δ 1,05 (3H, dd), 1,4 (9H, s), 1,5 (3H, d), 2,0-3,5 (6H, m), 3,5-4,1 (2H, m), 4,4 (1H, m), 5,2 (2H, s), 5,35 (1H, s largo), 7,25 (5H, s), 7,4 (5H, s), EM DCI, NH_3 ($M+H$)⁺ = 417,5.

h) 1-(1-carboxietíl)-3-benzil-5-(1-t-butiloxicarbonilaminoetyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-2-ona (8)

A uma solução agitada do éster benzílico anterior (7a, 0,5 g) em dioxano (10 ml) adicionou-se NaOH aquoso 1N (2 ml). Após agitação durante 16 h, adicionou-se HCl aq. 1N (2 ml) e extractou-se a solução com EtOAc (100 ml), lavou-se com salmoura, secou-se sobre $MgSO_4$ e evaporou-se até à secura. Obteve-se o ácido puro, na forma de uma mistura de isómeros, por cromatografia flash sobre sílica gel eluído com $CHCl_3$, MeOH, HOAc (97:3:0,1) (0,48 g): TLC R_f 0,4 (sílica, $CHCl_3$:MeOH:HOAc 95:4:1); 1H RMN

(CDCl₃ δ 1,1 (3H, d, J=6Hz), 1,4 (9H, s), 1,45 (3H, d, J=6Hz), 2,0-3,0 (4H, m), 3,2-3,7 (2H, m), 3,7-4,3 (3H, m), 5,2 (1H, m), 5,35 (1H, s largo), 7,3 (5H, s), 9,6 (1H, s largo).

i) éster metílico de 2-[2-oxo-3-benzil-5-(1-t-butiloxicarbonilaminoetil)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina (9)

A uma solução agitada do ácido anterior (8) em DMF (15 ml) adicionou-se HCl.Val-Val-OMe (0,4 g), HOBt (0,27 g), NEt₃ (0,8 ml) e reagente BOP (0,62 g). Agitou-se a mistura reaccional durante 16 h à temperatura ambiente e evaporou-se até à secura. Obteve-se o produto, na forma de uma mistura de diastereómeros, na forma de uma espuma sólida, por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com EtOAc a 65% em n-hexano (0,64 g, 83%): TLC R_f 0,64 (sílica, EtOAc a 70%, n-hexano); ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,8-1,0 (12H, dd) g(CH₃)₂ da valina, 1,15 (3H, d, J=6Hz) β CH₃ da alanina, 1,4 (9H, s) Boc t-butilo, 3,7 (3H, s) éster metílico, 5,4 (1H, s largo) CH olefínico, 7,3 (5H, s) fenilo.

j) Éster metílico de 2-[2-oxo-3-benzil-5-(1-(N-benziloxicarbonil)alanilamino-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina (10)

Tratou-se o produto anterior (9, 0,64 g) com HCl saturado/dioxano (50 ml) com agitação durante 1 h à temperatura ambiente. Evaporou-se a mistura reaccional, tritou-se com éter e filtrou-se. Dissolveu-se o pó branco seco em DMF (15 ml) ao qual se adicionou, com agitação, Cbz-Ala (0,29 g), HOBt (0,25 g), NEt₃ (0,13 ml), seguidos por DCC (0,29 g). Agitou-se a mistura reaccional durante 16 h à temperatura ambiente e evaporou-se até à secura. Obteve-se o produto, na forma de uma mistura de diastereómeros, por cromatografia sobre sílica gel eluído com 1% de MeOH em CHCl₃ (0,13 g): TLC R_f 0,38 (sílica, MeOH a 5%, CHCl₃); ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,8-1,0 (12H, m) g(CH₃)₂ da valina, 1,2 (3H, d, J=6Hz), 1,35 (3H, d, J=6Hz), 1,4 (3H, d, J=6Hz) β CH₃ da alanina, 3,75 (3H, s), éster metílico, 5,1 (2H, s) CH₂ do uretano, 7,3 (5H, s) anel fenilo, 7,4 (5H, s) uretano fenilo; EM (FAB, DTT/DTE) (M+H)⁺ = 734,6, (M-H)⁻ = 732,6.

(11)
k) éster metílico de 2-[2-oxo-3-benzil-5-(1-alanilamino-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina

Tratou-se 100 mg do composto (10) com HF (20 ml) a 0°C durante 30 min, num dispositivo de HF e evaporou-se até à secura com um ejector a água. Secou-se o resíduo sob alto vácuo e depois tritou-se e filtrou-se em éter. Dissolveu-se o sólido em 10% de HOAc em água e liofilizou-se para dar o composto do título na forma de um sólido solto branco. A HPLC de fase inversa (Apex C-18, 40% de CH₃CN, 0,1% de TFA, 60% 0,1% de TFA, H₂O) indicou 3 picos numa razão de (1:1:2). Isolou-se cada pico por HPLC preparativa e mostrou-se por EM (FAB, DTT/DTE) que possuam massas idênticas (M+H)⁺ = 600, (M-H)⁻ = 598.

Exemplo 2

Preparação do éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-alanilamino-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina (16)

Prepara-se o composto 16, do esquema 2 apresentado anteriormente, como se segue:

a) éster metílico de N-[5-t-butiloxicarbonil-3-(1-ftalilamino-etyl)-(Z)-pent-3-enil]-alanina (4b)

A uma solução agitada de éster metílico de HCl-alanina (13 g) em metanol (250 ml) à temperatura ambiente sob Ar adicionou-se acetato de sódio (9,8 g) seguido por éster N-ftalílico do aldeído (3) (21,3 g) preparado como no exemplo 1. Após agitação durante 5 min, arrefeceu-se a mistura reacional num banho de gelo e adicionou-se NaBH₃CN (5,7 g), em porções, durante 15 min (formação de espuma). Agitou-se a mistura reacional durante 16 h à temperatura ambiente, evaporou-se até à secura, retomou-se em EtOAc, lavou-se com H₂O, secou-se sobre Na₂SO₄ e evaporou-se. A cromatografia flash sobre sílica gel eluída com EtOAc a 40% em n-hexano produziu o produto, uma mistura de diastereómeros, na forma de um óleo (13,8 g, 52%): TLC R_f 0,36 (sílica, 50% de EtOAc-n-hexano).

b) 1-(1-metoxicarboniletil)-5-(1-ftalilaminoetil)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-2-ona (5b)

A uma solução agitada do éster t-butílico anterior (4b) (13,8 g) adicionou-se TFA a 80% em CH_2Cl_2 (100 ml). Após 1 h à temperatura ambiente evaporou-se a mistura reaccional até à secura. Retomou-se o resíduo duas vezes em HCl sat/dioxano e re-evaporou-se até à secura. Dissolveu-se depois o resíduo em DMF (500 ml) e adicionou-se NEt_3 (6,6 ml), NaHCO_3 (9,8 g) com agitação sob Ar a 0°C, e finalmente difenilfosforilazida (10,1 ml). Manteve-se a mistura reaccional arrefecida a 0°C num balão de Dewar agitou-se durante 2 dias. Evaporou-se a mistura reaccional até à secura, retomou-se em EtOAc, lavou-se com H_2O , salmoura, secou-se sobre MgSO_4 evaporou-se. A cromatografia flash sobre sílica gel eluída com EtOAc a 50-60% em n-hexano produziu o produto na forma de uma mistura de diasterómeros. (5,14 g, 59%): TLC R_f 0,25 (sílica, EtOAc a 50%, n-hexano), ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,4 (3H, dd), 1,65 (3H, d, $J=7\text{Hz}$), 2,4 (2H, s largo), 3,75 (3H, d), 3,2-3,7 (4H, m), 4,8 (1H, m), 5,2 (1H, m), 5,85 (1H, t), 7,85 (4H, m).

c) 1-(1-metoxicarbonil-etil)-5-(1-t-butiloxicarbonilamino-etil)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-2-ona (6b)

A uma solução agitada do composto anterior (6b) (5,14 g) em etanol (150 ml) adicionou-se mono-hidrato de hidrazina (1,35 ml). Deixou-se a mistura reaccional em agitação à temperatura ambiente durante 3 dias, evaporou-se até à secura, retomou-se em CHCl_3 , filtrou-se para a remoção total dos materiais insolúveis e evaporou-se até à secura. Dissolveu-se a amina livre em THF (100 ml) e, com agitação, adicionou-se dicarbonato de di-t-butilo (4,8 g). Após agitação durante 16 h, evaporou-se a mistura reaccional até à secura. A cromatografia flash sobre sílica gel eluída com EtOAc a 50-60% em n-hexano produziu o produto, uma mistura de diastereómeros, na forma de um óleo espesso. (3,13 g, 66%): TLC R_f 0,26 (sílica, EtOAc a 50%, n-hexano), ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,25 (3H, d, $J=6\text{Hz}$), 1,4 (9H, s), 1,45 (3H, d, $J=6\text{Hz}$), 2,3 (2H, s largo), 3,7 (3H, s), 3,2-3,7 (4H, m), 4,1 (1H, m), 5,2 (1H, m), 5,65 (1H, t).

d) 1-(1-metoxicarbonil-etil)-3-benzil-5-(1-t-butiloxicarbonilamino-etil)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-2-ona (7b)

A uma solução agitada do composto anterior (6b) (3,1 g) em THF seco (250 ml) a -78°C sob Ar, adicionou-se hexametildisilazano de lítio (19 ml, 1N em THF). Após agitação durante 30 min adicionou-se iodeto de benzilo (1,8 ml) numa porção. Após agitação durante 1,5 h extinguíu-se a reacção com NH₄Cl sat., extractou-se com EtOAc, lavou-se com H₂O, secou-se sobre MgSO₄ e evaporou-se. A cromatografia flash sobre sílica gel eluída com 35-60% de EtOAc em n-hexano deu o produto na forma de uma mistura de diastereómeros (2,22 g, 60%) assim como material de partida recuperado (1,07 g). TLC R_f 0,49 (sílica, 40% de EtOAc, n-hexano); ¹H RMN (CDCl₃) δ 1,2 (3H, dd), 1,4 (9H, s), 1,45 (3H, d), 2,3 (2H, s largo), 2,6-3,0 (1H, m), 3,2-3,6 (2H, m), 3,7 (3H, d), 3,9 (3H, m), 4,6 (1H, m), 5,15 (1H, m), 5,4 (1H, s largo), 7,3 (5H, s); EM (DCI, NH₃) (M+H)⁺ = 431,2.

e) 1-(1-benziloxicarbonil-etil)-3-benzil-5-(1-t-butiloxi-carbonilamino-etil)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-2-tiona (12)

A uma solução agitada do composto anterior (7b) (2,2 g) em tolueno seco (50 ml) adicionou-se, à temperatura ambiente, reagente de Lawesson (1,2 g). Agitou-se a suspensão sob Ar a 80°C durante 4 h (após 15 min a mistura reaccional tornou-se limpida), evaporou-se e purificou-se por cromatografia flash eluída com EtOAc a 30-40% em n-hexano. Utilizou-se na reacção seguinte uma fracção (1,78 g) que continha principalmente a tioamida com algum material de partida. TLC R_f 0,58 (sílica, EtOAc a 40%, n-hexano); ¹H RMN (CDCl₃) δ 1,1 (3H, dd), 1,4 (9H, s), 1,5 (3H, dd), 2,35 (2H, s largo), 2,8-3,2 (1H, m), 3,3-3,6 (1H, m), 3,7 (3H, s), 3,7-4,7 (6H, m), 5,4 (1H, s largo), 7,3 (5H, s); EM (DCI, NH₃) (M+H)⁺ = 447,2.

f) 1-(1-metoxicarbonil-etil)-3-benzil-5-(1-t-butiloxicarbonilamino-etil)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepina (13)

A uma solução agitada do composto anterior (12) (1,78 g) em CH₂Cl₂ (4 ml) a 0°C sob Ar adicionou-se tetrafluoroborato de trietiloxónio (3,9 ml 1N em CH₂Cl₂). Agitou-se a mistura reaccional durante 5 min a 0°C e depois durante 45 min à temperatura

ambiente, evaporou-se até uma espuma, dissolveu-se em metanol (6 ml) e arrefeceu-se a 0°C. Adicionou-se então NaBH₄ (0,32 g), em porções, com agitação (exotérmica!). Agitou-se a mistura reaccional a 0°C durante 10 min e depois à temperatura ambiente durante 2 h, extinguíu-se com HCl aquoso 1N (10 ml) e evaporou-se até à secura. Retomou-se o resíduo em EtOAc, lavou-se com NaHCO₃ sat., salmoura, secou-se sobre Na₂SO₄ e evaporou-se. A cromatografia flash sobre sílica gel eluída com EtOAc a 30-40% em n-hexano deu o produto na forma de uma mistura de diastereómeros (0,7 g) juntamente com amida que não reagiu (0,3 g). TLC R_f 0,53 (sílica, EtOAc a 30%, n-hexano); ¹H RMN (CDCl₃) δ 1,2 (6H, m), 1,4 (9H, s), 2,2-3,0 (9H, m), 3,4 (1H, m), 3,65 (3H, d), 4,1 (1H, m), 4,5 (1H, d, J=8Hz), 5,6 (1H, s largo), 7,3 (5H, s); EM (DCI, NH₃) (M+H)⁺ = 417,2.

g) éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-t-butiloxicarbonilamino-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina (14)

A uma solução agitada do composto anterior (13) (0,7 g) em MeOH (10 ml) adicionou-se NaOH aquoso 1N (6 ml). Após agitação durante 16 h, adicionou-se HCl aquoso 1N (8 ml) e evaporou-se a mistura reaccional até à secura. Após secagem sob vácuo durante a noite retomou-se o resíduo em DMF (20 ml) e adicionaram-se HCl. H-Val-Val-OMe (0,9 g), HOEt (0,5 g), NEt₃ (1,4 ml) e reagente Bop (1,5 g) com agitação. Agitou-se a mistura reaccional durante 16 h e evaporou-se até à secura. A cromatografia flash sobre sílica gel eluída com EtOAc a 45% em n-hexano produziu o produto (14) na forma de uma mistura de diastereómeros (0,3 g): TLC R_f 0,42 (sílica, EtOAc a 50%, n-hexano); ¹H-RMN (CDCl₃) δ 1,0 (12H, m) γ (CH₃)₂ da valina, 1,2 (6H, m) CH₃ da alanina, 1,4 (9H, s) Boc t-butilo, 3,75 (3H, s) éster metílico, 5,6 (1H, s largo) CH olefínico, 6,7 (1H, d, J=7Hz) NH do uretano, 7,3 (5H, s) fenilo.

h) éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-alanilamino-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina (15)

Ao composto (14) anterior (0,3 g) adicionou-se HCl sat./dioxano com agitação à temperatura ambiente. Após agitação durante 1 h evaporou-se a mistura reaccional até à secura e tritou-se com

éter e filtrou-se para dar o di-hidrocloreto na forma de um pó branco (0,28 g). Ao di-hidrocloreto em DMF (10 ml) adicionou-se NET_3 (0,21 ml) seguido por $(\text{Boc-Ala})_2\text{O}$, obtido a partir de Boc-alanina (0,3 g) e DCC (0,16 g). Agitou-se a mistura reaccional durante 4 h à temperatura ambiente e evaporou-se até à secura. A cromatografia flash sobre sílica gel eluída com EtOAc a 60% em n-hexano produziu o produto (15) na forma de uma mistura de isómeros (0,27 g, 77%): TLC R_f 0,23 (sílica, EtOAc a 60%, n-hexano), R_f =,68 (sílica, MeOH a 5%, CHCl_3); ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,0 (12H, m) $(\text{CH}_3)_2$ da valina, 1,2-1,4 (9H, m) β CH_3 da alanina, 1,45 (9H, s) Boc t-butilo, 3,75 (3H, s) éster metílico, 5,6 (1H, s largo) CH olefínico, 7,3 (5H, s) fenilo.

i) éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-alanilamino-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepinil]-1-oxo-propil-valinil-valina (16)

Tratou-se o Boc-péptido (15) anterior (0,27 g) com 80% de TFA em CH_2Cl_2 , com agitação, durante 30 min, e evaporou-se até à secura. A trituração e a filtração em éter deram o produto do título na forma de um pó (0,23 g). A HPLC (PRP-1, CH_3CN a 23% TFA a 0,1%/TFA a 0,1%, H_2O) do produto bruto mostrou 4 picos. A HPLC preparativa utilizando as mesmas condições produziu 3 fracções; as primeiras duas fracções continham predominantemente um único pico, cada uma com pureza >90% e a terceira fracção continha uma mistura dos dois últimos picos. Todas as três fracções possuíam massas idênticas, como se analisou por EM (FAB, DTT/DTE) $(\text{M}+\text{H})^+ = 586$.

Exemplo 3

Preparação do éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-fenilalanil)amino-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina

a) éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-(t-butiloxicarbonil-fenilalanilamino)-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina

Preparou-se este composto de uma maneira similar ao composto (15) no exemplo 2 utilizando $(\text{Boc-Phe})_2\text{O}$ em vez de $(\text{Boc-Ala})_2\text{O}$. Ao di-hidrocloreto do composto (14) (100 mg), preparado como no

exemplo 2, em DMF (5 ml) adicionou-se NET_3 (47 μl) seguida por $(\text{Boc-Phe})_2\text{O}$, obtido a partir da Boc-fenilalanina (0,18 g) e DCC (0,07 g). Agitou-se a mistura reaccional durante 16 h à temperatura ambiente e evaporou-se até à secura. A cromatografia flash sobre sílica gel eluída com EtOAc a 60% em n-hexano produziu o produto na forma de uma mistura de isómeros. TLC R_f 0,35 (sílica, EtOAc a 60%, n-hexano).

b) éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-fenilalanil)amino-etyl]-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina

Tratou-se o Boc-péptido preparado anteriormente com TFA a 80% em CH_2Cl_2 com agitação durante 30 min e evaporou-se até à secura. A trituração e filtração em éter/éter de pet. deram o produto na forma de uma mistura de isómeros. A HPLC (PRP-1, CH_3CN a 30%, TFA a 0,1%/TFA a 0,1%, H_2O) do produto bruto mostrou 4 picos. A HPLC preparativa utilizando as mesmas condições produziu 3 fracções; a primeira fracção contendo o primeiro pico, a segunda fracção contendo o segundo e o terceiro pico, e a terceira fracção contendo uma mistura dos dois últimos picos. Todas as três fracções possuíam massas idênticas como analisado por FAB-EM DTT/DTE $(\text{M}+\text{H})^+ = 662,3$.

Exemplo 4

Preparação do éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-(alanil-alanil)amino-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina

Substituindo por Boc-Ala-Ala-OH e um agente acoplante tal como DCC/HOBt ou Bop o $(\text{Boc-Ala})_2\text{O}$, no procedimento do exemplo 2, obteve-se o éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-(alanil-alanil)-(amino-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valinil-valina.

Exemplo 5

Preparação do éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-alanilamino-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxo-propil-valina

Utilizando HCl.H-val-OMe em vez de HCl.H-Val-Val-OMe no procedimento do exemplo 2 obtém-se o éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-alanilamino-etyl)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-

[Handwritten signature]

-oxo-propil-valina.

Exemplo 6

Preparação do éster metílico de 2-(2-hidroxi-3-benzil-5-metil-ciclo-hept-4-en-1-il)-1-oxo-etil-valinil-valina (25)

O Composto 25 do esquema 3 esquematizado anteriormente é preparado como se segue:

a) 4-metil-1-metoxi-1,3-ciclo-hexadieno (17)

Numa solução mecanicamente agitada de 4-metilanisolo (47 g) em éter etílico (100 ml) e t-butanol (60 g) condensou-se amoníaco (500 ml) gota a gota, por meio de um dedo frio. Adicionou-se em seguida arame de lítio (7,7 g) com agitação vigorosa, em porções, durante 15 min, período de tempo durante o qual a solução se tornou azul escura (ligeiramente exotérmica). Após agitação durante 1 h, extinguiu-se lentamente a reacção com etanol (~ 80 ml) durante 30 min. Aqueceu-se então a mistura reaccional, agora branca, até à temperatura ambiente para permitir que todo o amoníaco se evaporasse. Retomou-se o material restante em éter, lavou-se com água, NaCl saturado, secou-se sobre Na_2SO_4 e evaporou-se no vaporizador rotativo (sem aquecimento externo, o produto é extremamente volátil). (17); CD TA 6,88 min (coluna de metilsilicone HP 530 $\text{m}\mu$ x 20 m, caudal do transportador He 20 ml/min, 60°C isotérmica). O CD mostrou a permanência de 4% do material de partida. ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,7 (3H, s), 2,7 (4H, s), 3,5 (3H, s), 4,65 (1H, s largo), 5,4 (1H, s largo).

b) 4-metil-3-ciclo-hexen-1-oná (18)

Ao enoléter anterior (17), sem purificação adicional, em acetato de etilo (250 ml), adicionou-se, com agitação vigorosa, HCl aquoso 1N (150 ml). Agitou-se a suspensão de duas fases durante 1 h e depois verteu-se num funil de separação. Removeu-se a fase de acetato de etilo e re-extractou-se a fase aquosa restante uma vez mais com acetato de etilo fresco. Combinaram-se as fases de acetato de etilo, lavaram-se com NaCl saturado, secaram-se sobre MgSO_4 e depois evaporaram-se isentas de solvente para dar o produto (18) (39,60 g, 94%) na forma de um líquido límpido (sem aquecimento externo, o produto irá evaporar se não houver cuida-

do). CD TA 4,29 min (coluna de metilsilicone HP 530 μ x 20 m, caudal do transportador He 20 ml/min, 60°C isotérmica); TLC R_f 0,41 (acetato de etilo a 5%, n-hexano); 1H RMN ($CDCl_3$) δ 1,8 (3H, s largo), 2,48 (4H, s largo), 2,88 (2H, s largo), 5,5 (1H, s largo).

c) 2-benzil-4-metil-3-ciclo-hexen-1-ona (19)

A uma solução agitada do composto (18) anterior (6,1 g) em THF seco (100 ml) a -78°C adicionou-se uma solução de bis-trimetilsililamida de lítio (50 ml, 1N em THF). Agitou-se a solução durante 20 min e então adicionou-se brometo de benzilo (30 ml) numa porção. Agitou-se a mistura reaccional durante 6 h a -78°C e então deixou-se aquecer lentamente até à temperatura ambiente. Após evaporação do solvente, retomou-se a mistura restante em hexano, lavou-se com NaCl saturado, secou-se sobre $MgSO_4$ e evaporou-se. Obteve-se o produto (19) por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com acetato de etilo a 2,5% em hexano. (4,15 g, 39%): CD TA 7,29 min (coluna de metilsilicone 530 μ x 20 ml/min, 100°C, 1 min, 100-180°C 10°C/min; TLC R_f 0,31 (acetato de etilo a 5%, n-hexano); 1H RMN ($CDCl_3$) δ 1,73 (3H, s largo), 2,2-3,3 (7H, m), 5,35 (1H, s largo), 7,28 (5H, m).

d) 2-benzil-4-metil-3-ciclo-hepten-1-ona-7-carboxilato de t-butilo (20) e 3-benzil-5-metil-4-ciclo-hepten-1-ona-2-carboxilato de t-butilo (21)

A uma solução agitada de cetona (19) anterior (8,18 g) em cloreto de metileno (18 ml) a -78°C, adicionou-se uma solução fria de tetra-fluoroborato de trietiloxónio (28 ml, 1N em CH_2Cl_2). Imediatamente depois adicionou-se diazoacetato de t-butilo (4,1 ml) e agitou-se a mistura reaccional durante 15 min a -78°C e então deixou-se aquecer lentamente num banho de gelo. Após parar a libertação de gás (~ 15 min), extinguiu-se a reacção por adição de $NaHCO_3$ aquoso saturado (150 ml) e agitou-se durante mais 15 min. Removeu-se a fase orgânica e re-extractou-se a fase aquosa com CH_2Cl_2 fresco. Combinaram-se então as fases de CH_2Cl_2 , secaram-se sobre $MgSO_4$ e evaporaram-se. Obteve-se o produto (20) por cromatografia sobre sílica gel (5,0 x 100 cm) eluindo com acetato de etilo a 2,5% em n-hexano (2,11 g, 17,4%). Ob-

[Handwritten signature]

teve-se outra fracção de eluição posterior que correspondia ao outro regioisómero (21) (3,71 g, 30,6%).

(20): TLC R_f 0,57 (acetato de etilo a 10%, n-hexano); EM DCI/NH₃ (M+NH₄)⁺=332; ¹H RMN (CDCl₃) δ (M = maioritário, m = minoritário) 1,3M e 1,43m (9H, 2s), 1,67M e 1,72m (3H, 2s), 2,0-2,5 (4H, m), 2,77 (1H, 2dd) CH benzílico maioritário e minoritário, 3,12M e 3,27m (1H, 2dd) CH benzílico, 3,39M e 3,53m (1H, 2dd) CH do malonilo, 3,69m e 4,08M (1H, 2 s largo) CH alílico, 5,04M e 5,16m (1H, 2 s largo) CH do vinilo, 7,22 (5H, s) fenilo.

(21): TLC R_f 0,53 (acetato de etilo a 10%, n-hexano); EM DCI/NH₃ (M+NH₄)⁺=332; ¹H RMN (CDCl₃) δ 1,34m e 1,49M (9H, s e d), 1,68M e 1,77m (3H, 2s), 2,2-3,1 (6H, m), [CH₂ benzílico maioritário a δ 2,60 (1H, dd) e 2,79 (1H, dd)], 3,3 (1H, s largo) CH alílico, 3,48m e 3,53M (1H, 2d) CH do malonilo, 5,28M e 5,43m (1H, 2d) CH do vinilo, 7,32 (5H, s) fenilo.

e) (1-t-butiloxicarbonil-2-oxo-3-benzil-5-metil-ciclo-hept-4-en-1-il) etanoato de metilo (22)

A uma solução agitada do β -ceto-éster (20) anterior (2,0 g) em THF seco (50 ml) sob argón à temperatura ambiente, adicionou-se NaH (0,4 g, dispersão em óleo a 60%). Após 15 min adicionou-se bromoacetato de metilo (3 ml) e manteve-se a mistura reaccional ao refluxo a 80°C sob argón durante 16 h. Parou-se a reacção com HCl aquoso 1N e extractou-se com acetato de etilo, lavou-se com NaCl saturado, secou-se sobre MgSO₄ e evaporou-se. Obteve-se o produto por cromatografia flash sobre sílica gel eluindo com 5% de acetato de etilo em n-hexano (1,35 g). Recuperou-se também material de partida que não reagiu (1,12 g) e re-submeteu-se à reacção anterior para se obter produto adicional (0,91 g, 92% no total): TLC R_f 0,16 (acetato de etilo a 5%, n-hexano); ¹H RMN (CDCl₃) δ 1,44 (9H, s) CO₂t-Bu, 1,64 (3H, s) CH₃ alílico, 3,6 (3H, s) CO₂CH₃, 4,03 (1H, s largo) CH alílico, 5,05 (1H, s largo) CH do vinilo, 7,29 (5H, s) fenilo.

f) (2-oxo-3-benzil-5-metil-ciclo-hept-4-en-1-il)etanoato de metilo (23)

A uma solução agitada do di-éster (22) anterior (1,35 g) em CH_2Cl_2 (20 ml) adicionou-se ácido trifluoroacético (80 ml). Após agitação durante 45 min evaporou-se a mistura reaccional até à secura e re-evaporou-se duas vezes com tolueno fresco para remover qualquer TFA residual. Retomou-se o óleo que permaneceu em tolueno (100 ml) e manteve-se ao refluxo sob Ar durante 1 h. Obteve-se o produto (23) após evaporação e purificação por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com acetato de etilo a 10% em n-hexano (0,85 g, 85%).

(23): TLC R_f 0,25 (acetato de etilo a 10%, n-hexano); ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,71 (3H, s) CH_3 alílico, 3,6 (3H, s) CO_2CH_3 , 3,8 (1H, s largo) CH alílico, 5,12m e 5,20M (1H, s largo e d) CH do vinílo, 7,23 (5H, s) fenilo.

g) éster metílico de 2-(2-oxo-3-benzil-5-metil-ciclo-hept-4-en-1-il)-1-oxo-etyl-valinil-valina (24).

Ao ceto-éster (23) anterior (0,51 g) em dioxano, água 4:1 (10 ml) adicionou-se $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (82 mg). Agitou-se a mistura reaccional durante a noite à temperatura ambiente, evaporou-se, retomou-se em acetato de etilo, lavou-se com HCl aquoso 1N, NaCl saturado, secou-se sobre MgSO_4 e evaporou-se para dar o ceto-ácido bruto. Dissolveu-se o ácido em DMF (10 ml) ao qual se adicionou $\text{HCl} \cdot \text{Val-Val-OMe}$ (0,51 g), trietilamina (1,5 ml), hidroxibenzotriazolo (0,48 g) seguidos por reagente Bop (1,57 g). Agitou-se a mistura reaccional durante a noite à temperatura ambiente e evaporou-se até à secura. Obteve-se o produto (24) na forma de uma mistura de diastereómeros por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com acetato de etilo a 50% em n-hexano- (0,44 g, 51%) (24); TLC R_f 0,24 e 0,26 (acetato de etilo a 40%, n-hexano); ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,8-1,0 (12H, m) $\gamma(\text{CH}_3)_2$, do Val, 1,7 (3H, s) CH_3 alílico, 3,7 (3H, s) CO_2CH_3 , 3,8 (1H, s largo) CH alílico, 4,55 (2H, dd), 5,15 (1H, m) CH vinílico, 7,25 (5H, s) fenilo.

h) éster metílico de 2-(2-hidroxi-3-benzil-5-metil-ciclo-hept-4-en-1-il)-1-oxo-etil-valinil-valina (25)

Ao ceto-péptido (24) anterior (0,44 g) em etanol (20 ml) com agitação à temperatura ambiente, adicionou-se NaBH_4 (69 mg) numa porção. Após agitação durante 30 min, extinguiu-se a reacção por adição de HCl aquoso 1N (50 ml). Extractou-se a mistura reacional com acetato de etilo, lavou-se com NaCl saturado, secou-se sobre MgSO_4 e evaporou-se até à secura. Obteve-se o composto do título na forma de uma mistura de diastereómeros por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com acetato de etilo a 60% em n-hexano e depois por cromatografia de densidade no mesmo sistema. TLC R_f 0,31 e 0,36 (acetato de etilo a 60%, n-hexano); EM $(\text{DCI}/\text{NH}_3)^+ = 487$; ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,8-1,0 (12H, m) $(\text{CH}_3)_2$, do Val, 1,7 (3H, s) CH_3 alílico, 3,72 (3H, s) CO_2CH_3 , 5,18 m e 5,08 (1H, s largo) CH vinílico, 7,30 (5H, s) fenilo.

Exemplo 7

Preparação do éster metílico de 2-(2-hidroxi-3-benzil-5-metil-ciclo-hept-5-en-1-il)-1-oxo-etil-valinil valina

Utilizando o procedimento do exemplo 6 como esboçado no esquema 3, com exceção de se realizar o passo 6(c) da benzilação (com brometo de benzilo) após o passo 6(d) da expansão do anel, obtém-se o composto do título.

Exemplo 8

Preparação do éster metílico de 2-(2-hidroxi-3-benzil-5-t-butil-ciclo-hept-4-en-1-il)-1-oxo-etil-valinil valina

Utilizando 4-t-butilanisolo em vez do 4-metilanisolo, no procedimento do exemplo 6, obtém-se o composto do título.

Exemplo 9

Preparação de éster metílico de 2-(2-hidroxi-3-(4-imidazolil)metil-5-metil-ciclo-hept-4-en-1-il)-1-oxo-etil-valinil-valina

Utilizando brometo de (4-imidazolil)metilo em vez do brometo de benzilo no procedimento do exemplo 6, obtém-se o composto do título.

Exemplo 10

Preparação do éster metílico de 2-(5-[(1S)-1-alanilamino-etyl]-3-benzil-2-hidroxi-ciclo-hept-4-eno-1-il)-1-oxo-etyl-valinil-valina (41)

O composto 41 do esquema 4 esboçado anteriormente é preparado como se segue:

a) 4-(S)-benzil-3-(4-metoxi)fenilacetil-2-oxazolidinona (26)

A uma solução de ácido 4-metoxifenilacético (50 g) em tolueno seco (10 ml), adicionou-se cloreto de oxalilo (50 ml). Agitou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 16 h, evaporou-se até à secura e re-evaporou-se em tolueno várias vezes para remover qualquer excesso de cloreto de oxalilo. Adicionou-se em seguida este cloreto de ácido bruto (57,2 g) a uma solução do sal de lítio de (S)-4-benzil-2-oxazolidinona a -78°C, preparado a partir de uma solução de (S)-4-benzil-2-oxazolidinona (60 g) em THF seco (700 ml) à qual se adicionou uma solução de n-butil-lítio (130 ml, 2,5N em n-hexano) a -78°C com agitação durante 10 min. Após agitação durante mais 1 h a -78°C extinguiu-se a reacção com NH₄Cl saturado, extractou-se com acetato de etilo, lavou-se com NaCl saturado, secou-se sobre MgSO₄ e evaporou-se. Obteve-se o produto (26) por cristalização em acetato de etilo, n-hexano (67,74 g, 70%): TLC R_f 0,31 (acetato de etilo a 20%, n-hexano); ¹H RMN (CDCl₃) δ 2,77 (1H, dd), 3,29 (1H, dd), 3,8 (3H, s), 4,19 (2H, d, J=6 Hz), 4,27 (2H, s), 4,7 (1H, m), 6,85-7,45 (9H, m).

b) (2S,4S)-4-benzil-3-(1-oxo-2-(4-metoxifenil)propil)-2-oxazolidinona (27)

A uma solução agitada da amida quiral (26) anterior (67,6 g) em THF seco (500 ml) a -78°C sob Ar, adicionou-se uma solução de bis-trimetilsililamida de lítio (223 ml, 1N em THF). Após agitação durante 15 min adicionou-se iodeto de metilo (21 ml) de uma porção. Agitou-se a mistura reaccional durante 1 h a -78°C e depois deixou-se aquecer até 0°C durante 1 h, extinguiu-se com NH₄Cl saturado, extractou-se com acetato de etilo, lavou-se com NaCl saturado, secou-se sobre MgSO₄ e evaporou-se. Obteve-se o produto (27) por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com

acetato de etilo a 20% em n-hexano (56,22 g, 80%). A HPLC analítica mostrou que os diastereómeros eram separáveis com a mistura reacional bruta dando um excesso diastereomérico de ~88% e obteve-se o produto por cromatografia flash possuindo um e.d. de >95%. Pode-se obter uma amostra opticamente pura (27) por cristalização em acetato de etilo/n-hexano: R_f 0,49 (acetato de etilo a 20%, n-hexano); HPLC (Zorbax 4,6x250 mm, sílica gel, 1,5 ml/min) TA 8,87 min; 1H RMN ($CDCl_3$) δ 1,55 (3H, d, $J=7Hz$), 2,9 (1H, m), 3,4 (1H, dd), 3,8 (3H, s), 4,12 (2H, m), 4,62 (1H, m), 5,15 (1H, q), 7,15 (4H, q), 7,35 (5H, s largo).

c) ácido (2S)-2-(4-metoxifenil)propanóico (28)

A uma solução mecanicamente agitada da amida anterior (27) (56,2 g) em THF (750 ml) e H_2O (250 ml) a 0°C adicionou-se uma solução de hidroperóxido de lítio preparada por adição de uma solução de $LiOH \cdot H_2O$ (10,4 g) em H_2O (250 ml) a H_2O_2 a 30% (84 ml). Após agitação durante 1 h a 0°C destruiu-se o excesso de peróxido por adição lenta de uma solução de Na_2SO_3 (103 g) em H_2O (500 ml) (exotérmica!). Após a remoção da maioria do THF por evaporação, lavou-se a solução restante com CH_2Cl_2 duas vezes para remover a (S)-4-benzil-2-oxazolidinona recuperável, acidificou-se a pH ~2 com HCl 3N e extractou-se duas vezes com acetato de etilo para isolar o produto. Combinaram-se as fases de acetato de etilo, lavaram-se com NaCl saturado, secaram-se sobre $MgSO_4$ e evaporaram-se para dar o produto (28) puro por TLC (29,87 g, 100%). TLC R_f 0,49 ($CHCl_3:MeOH:HOAc$ 95:4:1) R_f 0,33 riscas ($CHCl_3:MeOH$ 98:2); 1H RMN ($CDCl_3$) δ 1,5 (3H, d, $J=7Hz$), 2,25 (2H, s largo), 2,78 (3H, s), 4,08 (1H, q), 7,15 (4H, q).

d) (1S)-N-benziloxicarbonil-1-(4-metoxifenil)-etilamina (29)

A uma solução agitada do ácido (28) anterior (29,87 g) em tolueno seco (300 ml) à temperatura ambiente equipada com um condensador de refluxo sob Ar, adicionou-se trietilamina (26 ml) seguida por difenilfosforilazida (38 ml). Colocou-se então a mistura reacional num banho de óleo a 80°C e agitou-se até parar a libertação de gás (~ 30 min). Adicionou-se em seguida álcool benzílico (17 ml) e agitou-se a mistura reacional durante 3 h a 80°C, evaporou-se, retomou-se em acetato de etilo, lavou-se com

H

Na_2CO_3 aquoso 1N, HCl aquoso 1N, NaCl saturado, secou-se sobre MgSO_4 e evaporou-se. Obteve-se o produto (29) por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com acetato de etilo a 20% em n-hexano. (42,87 g, 91%): TLC R_f 0,36 (CHCl_3) R_f 0,39 (20% de acetato de etilo, n-hexano).

e) (1S)-1-(4-metoxifenil)-etilamina (30)

Hidrogenou-se uma solução do composto (29) anterior (42,8 g) em metanol (300 ml) sobre 5% de Pd em carbono (~2 g) a $3,45 \times 10^5$ Pa (50 Psi) de H_2 durante 4 h num agitador Parr. Obteve-se o produto (30) após filtração do catalisador através de Celite^R, enxaguando com metanol fresco, e evaporação (22,9 g, 100%). CD TA 4,68 min (coluna de metilsilicone HP 530 $\text{m}\mu$ x 20 m, caudal do transportador He 20 ml/min, 100°C, isotérmica); ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,37 (3H, d, $J=7\text{Hz}$), 2,25 (2H, s largo), 2,78 (3H, s), 4,08 (1H, q), 7,15 (4H, q).

f) 1-[(1S)-1-aminoetil]-4-metoxi-1,4-ciclo-hexadieno (31)

A uma solução mecanicamente agitada da amina anterior (30) (24 g) em THF seco (200 ml) e t-butanol (12 g), condensou-se por meio de um dedo frio, amoníaco (800 ml). Adicionou-se em seguida arame de lítio (3,1 g) peça a peça durante 15 min e agitou-se a solução, agora azul escura, durante 1 h. Fez-se gotejar então etanol para a reacção muito lentamente durante 1 h até a mistura reacional ficar azul. Deixou-se então a mistura reacional aquecer até à temperatura ambiente, com aquecimento externo, para permitir que o amoníaco evaporasse. Retomou-se a mistura restante em éter etílico, lavou-se com H_2O , secou-se sobre Na_2SO_4 e evaporou-se para dar o produto do título (31): CD TA 5,63 min (coluna de metilsilicone HP 530 $\text{m}\mu$ x 20 m, caudal do transportador He 20 ml/min, 100°C, isotérmica).

g) 1-[(1S)-1-(1-benziloxicarbonilaminoetil)-4-metoxi-1,4-ciclo-hexadieno (32)

A uma solução agitada do dieno (31) anterior em THF (250 ml) adicionou-se de uma vez N-(benziloxicarboniloxi)-succinimida (40 g) (ligeiramente exotérmica) seguida por, após 15 min, trietila-

mina (23 ml). Agitou-se a mistura reaccional durante 16 h à temperatura ambiente, evaporou-se, retomou-se em acetato de etilo, lavou-se com Na_2CO_3 1N, NaCl saturado, secou-se sobre MgSO_4 e evaporou-se para dar o produto (32) bruto. TLC R_f 0,26 (acetato de etilo a 10%, n-hexano); $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ 1,24 (3H, d, $J=7\text{Hz}$), 2,73 (4H, s largo), 3,55 (3H, s), 4,27 (1H, q), 4,64 (1H, s largo), 4,78 (1H, d largo), 5,12 (2H, s), 5,64 (1H, s largo), 7,38 (5H, s).

h) 4-[(1S)-1-benziloxicarbonilaminoetil]-ciclo-hex-3-en-1-ona (33)

A uma solução vigorosamente agitada do dieno (32) anterior (44,2 g) em acetato de etilo (250 ml) adicionou-se HCl aquoso 1N (250 ml). Após agitação durante 1 h removeu-se a fase do acetato de etilo, lavou-se com NaCl saturado, secou-se sobre MgSO_4 e evaporou-se. Obteve-se o produto (33) por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com acetato de etilo a 35% em n-hexano (39,69 g, 91%). TLC R_f 0,51 (acetato de etilo a 30%, n-hexano); $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ 1,25 (3H, d, $J=7\text{Hz}$), 2,44 (4H, s largo), 2,88 (2H, s largo), 4,35 (1H, q), 4,95 (1H, d largo), 5,13 (2H, s), 5,72 (1H, t), 7,38 (5H, s).

i) 2-benzil-4-[(1S)-1-benziloxicarbonilaminoetil]-etil-hex-3-en-1-ona (34)

A uma solução agitada da cetona (33) anterior (14,93 g) em THF seco (200 ml) a -78°C sob Ar adicionou-se uma solução de bis-trimetilsililamida de lítio (55 ml, 1N em THF). Após agitação durante 20 min adicionou-se brometo de benzilo (35 ml) e agitou-se a mistura reaccional durante mais 6 h a -78°C e depois deixou-se aquecer lentamente até à temperatura ambiente. Retomou-se a mistura reaccional em acetato de etilo, lavou-se com HCl 1N, NaCl saturado, secou-se sobre MgSO_4 e evaporou-se. Obteve-se o produto (34) por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com acetato de etilo a 20-25% em n-hexano (6,09 g, 31%): TLC R_f 0,17 (acetato de etilo a 20%, n-hexano); $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ 1,12 (3H, d, $J=7\text{Hz}$), 2,0-3,2 (7H, m), 4,18 (1H, q), 5,1 (2H, s), 5,33 (1H, dd), 5,55 (1H, s largo), 7,22 (5H, m), 7,32 (5H, s).

j) (5-[(1S)-1-benziloxicarbonilamino-etyl]-3-benzil-2-oxo-ciclo-hept-4-en-1-il)-etanoato de metilo (35) e (5-[(1S)-1-benziloxicarbonilamino-etyl]-7-benzil-2-oxo-ciclo-hept-5-eno-1-il)-etanoato de metilo (36)

A uma solução agitada da cetona alquilada (34) anterior (7,8 g) em CH_2Cl_2 (24 ml) a -78°C sob Ar, adicionou-se uma solução de tetra-fluoroborato de trietiloxónio (37 ml, 1N em CH_2Cl_2). Imediatamente depois adicionou-se diazoacetato de t-butilo (5,4 ml) e agitou-se a mistura reaccional durante 10 min a -78°C e depois deixou-se aquecer até 0°C num banho de gelo enquanto subsistia a libertação de gás (~15 min). Interrompeu-se a reacção com NaHCO_3 aquoso saturado (100 ml) e agitou-se durante 15 min. Removeu-se a fase do CH_2Cl_2 e re-extractou-se a fase aquosa com CH_2Cl_2 fresco. Secaram-se então as fases de CH_2Cl_2 combinadas sobre MgSO_4 e evaporaram-se. Obteve-se o produto de anel expandido bruto por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com acetato de etilo a 20% em n-hexano (5,73 g, 89%). TLC R_f 0,33 e 0,30 (acetato de etilo a 20%, n-hexano).

A uma solução agitada do produto anterior (5,73 g) em THF seco (100 ml) à temperatura ambiente sob Ar, adicionou-se NaH (0,7 g, dispersão a 60% em óleo). Após agitação durante 15 min adicionou-se bromoacetato de metilo (5,0 ml) de uma vez e manteve-se a mistura reaccional ao refluxo durante 24 h. Extinguiu-se então a reacção com HCl aquoso 1N e extractou-se com acetato de etilo. Lavou-se a fase de acetato de etilo com NaCl saturado, secou-se sobre MgSO_4 e evaporou-se. Obteve-se o produto alquilado bruto por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com acetato de etilo a 25-30% em n-hexano (5,15 g, 78%). TLC R_f 0,37 e 0,42 (acetato de etilo a 30%, n-hexano).

A uma solução agitada do diéster anterior (5,15 g) em CH_2Cl_2 (40 ml) adicionou-se ácido trifluoroacético (160 ml). Agitou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 45 min e depois evaporou-se até à secura. Re-evaporou-se o ácido bruto em tolueno fresco duas vezes para remover quantidades vestigiais de ácido trifluoroacético e depois retomou-se em tolueno (150 ml) e mante-



ve-se ao refluxo durante 1 h sob Ar. Obtiveram-se os produtos (35) e (36) após evaporação por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com acetato de etilo a 30% em n-hexano. (2,6 g, 62%). A cromatografia de densidade (sílica gel, acetato de etilo a 25%/n-hexano) originou os regio-isómeros puros na forma de uma mistura de diastereómeros.

(35): TLC R_f 0,43 (acetato de etilo a 30%, n-hexano); 1H RMN ($CDCl_3$) δ 1,14 (3H, d, $J=7Hz$), 1,5-3,3 (9H, m), 3,57 (3H, s), 3,7 (1H, m), 4,15 (1H, m), 5,1 (2H, s), 5,5 (1H, d), 7,23 (5H, s), 7,38 (5H, s).

(36): TLC R_f 0,39, 0,35 (acetato de etilo a 30%, n-hexano); 1H RMN ($CDCl_3$) δ 1,2 (3H, m), 2,0-3,1 (9H, m), 3,55 (1H, m), 3,67 (3H, s), 4,12 (1H, m), 5,1 (2H, s), 5,3-5,7 (1H, m), 7,28 (5H, s), 7,36 (5H, s).

k) ácido (5-[(1S)-1-benziloxicarbonilaminoetil]-3-benzil-2-oxo-ciclo-hept-4-en-1-il)-etanóico (37)

A uma solução agitada do éster (35) anterior (1,2 g) em dioxano (12 ml) adicionou-se uma solução de NaOH (5,3 ml, 1N em H_2O). Após agitação durante 4 h à temperatura ambiente adicionou-se HCl 1N (5,3 ml) e extractou-se a mistura reaccional com acetato de etilo, lavou-se com NaCl saturado, secou-se sobre $MgSO_4$ e evaporou-se. Obteve-se o produto (37) por cromatografia flash (sílica gel, $CHCl_3:MeOH:HOAc$ 98:2:0,1 (1,0 g, 86%). TLC R_f 0,53 ($CHCl_3:MeOH:HOAc$ 95:4:1); EM DCI/NH_3 ($M+H$) $^+ = 436,3$; 1H RMN ($CDCl_3$) δ 1,13 (3H, d, $J=7Hz$), 1,6-3,3 (9H, m), 3,65 (1H, m), 4,1 (1H, m largo), 5,1 (2H, s), 5,45 (1H, d), 7,2 (5H, s), 7,35 (5H, s), 10,65 (1H, s largo).

l) éster metílico de 2-(5-[(1S)-1-benziloxicarbonilamino-etyl]-3-benzil-2-oxo-ciclo-hept-4-en-1-il)-1-oxo-etyl-valinil-valina (38)

A uma solução agitada do ácido (37) anterior (1,0 g) em dimetilformamida (20 ml) adicionou-se hidroxibenzotriazolo (0,62 g), HCl.Val-Val-OMe (0,67 g), trietilamina (1,93 ml) seguidos de

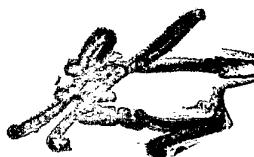
reagente Bop (1,93 g). Após agitação à temperatura ambiente durante 16 h evaporou-se a mistura reaccional até à secura e cromatografou-se por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com acetato de etilo a 60% em n-hexano para dar o produto do título (38) (0,95 g, 57%). TLC R_f 0,48, 0,41 (acetato de etilo a 60%, n-hexano) R_f 0,40, 0,37 ($CHCl_3:MeOH$ 97:3); EM DCI/ NH_3 ($M+H$) $^+$ = 648,5; 1H RMN ($CDCl_3$) δ 0,8-1,0 (12H, m) $(CH_3)_2$ de Val, 1,12 (3H, d, $J=7Hz$) CH_3 de Ala, 3,7 (3H, s) CO_2CH_3 , 5,1 (2H, s) Cbz CH_2 , 5,4 (1H, d) CH de vinilo, 7,22 (5H, s) fenilo, 7,46 (5H, s), Cbz fenilo.

m) éster metílico de 2-(5-[(1S)-1-benziloxicarbonilamino-etyl]-3-benzil-2-hidroxi-ciclo-hept-4-eno-1-il)-1-oxo-etyl-valinil-valina (39)

A uma solução agitada do composto (38) anterior (0,47 g) em etanol (15 ml) adicionou-se, à temperatura ambiente, $NaBH_4$ (55 mg). Após agitação durante 30 min extinguiu-se cuidadosamente a reacção com acetona e depois com HCl aquoso 1N. Extractou-se a mistura reaccional com acetato de etilo, lavou-se com NaCl saturado, secou-se sobre $MgSO_4$ e evaporou-se. Obteve-se o produto (39) na forma de uma mistura de isómeros por cromatografia flash sobre sílica gel eluída com $CHCl_3$ a 50% em acetato de etilo (0,42 g, 89%). TLC R_f 0,36, 0,33 ($CHCl_3:MeOH$ 97:3); EM DCI/ NH_3 ($M+H$) $^+=650,4$.

n) éster metílico de 2-(5-[(1S)-1-(t-butiloxicarbonilalanil)amino-etyl]-3-benzil-2-hidroxi-ciclo-hept-4-en-1-il)-1-oxo-etyl-valinil-valina (40)

Ao álcool anterior (39) (0,31 g) adicionou-se, com agitação sob Ar, anisolo (2 gotas) seguido por uma solução de HBr a 30% em ácido acético (15 ml). Após agitação durante 30 min à temperatura ambiente, evaporou-se a mistura reaccional e re-evaporou-se várias vezes em tolueno para remover qualquer excesso de ácido acético. Deixou-se o sólido alaranjado restante sob vácuo durante a noite (0,32 g). Ao sal de HBr bruto em dimetilformamida (10 ml), com agitação à temperatura ambiente, adicionou-se trietilamina (134 ml) seguida por uma solução de $(Boc-Ala)_2O$ [preparado a partir de Boc-Ala-OH (0,54 g) e diciclo-hexilcarbodiimida (0,3 g)



em CH_2Cl_2 (20 ml) com agitação à temperatura ambiente durante 30 min seguida por filtração através de Celite^R e concentração] em dimetilformamida (10 ml). Após agitação à temperatura ambiente durante 5 h evaporou-se a mistura reaccional até à secura. Obteve-se o produto na forma de uma mistura de isómeros por cromatografia flash (sílica gel, CHCl_3 seguido por $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 98:2): (0,29 g, 88%). Este produto foi identificado por EM (DCI/ NH_3) ($\text{M}+\text{H}$)⁺ = 729,4 como sendo quase totalmente o produto O-acetilado, presumivelmente a partir do anidrido acético no HBr/HOAc, e teve que ser saponificado com NaOH aquoso 1N em MeOH e re-esterificado com CH_2N_2 em éter/MeOH para dar o produto do título (40). TLC R_f 0,33, 0,35 ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 95:5); EM (DCI/ NH_3) $\text{M}+\text{H}$)⁺ 687; ^1H RMN (CDCl_3) δ 0,8-1,0 (12H, m) $(\text{CH}_3)_2$, de Val, 1,0-1,4 (6H, 2d) CH_3 de Ala, 1,45 (9H, s) Boc, 3,7 (3H, s) CO_2CH_3 , 7,28 (5H, s) fenilo.

o) éster metílico de 2-(5-[(1S)-1-(alanil)amino-etyl]-3-benzil-2-hidroxi-ciclo-hept-4-en-1-il)-1-oxo-etyl-valinil-valina (41)

A uma solução agitada de 30 mg de (40) em CH_2Cl_2 (1 ml) adicionou-se ácido trifluoroacético (10 ml). Após agitação durante 45 min evaporou-se a mistura reaccional até à secura, tritourou-se com éter, filtrou-se e secou-se sob vácuo para dar o composto do título (41) na forma de uma mistura de isómeros (24 mg, 75%).

Exemplo 11

Preparação de 2-(5,7-dioxo-6-benzil-4-[(1R)-1-(benziloxicarbonilalanil)amino-etyl]-hexa-hidro-1H,4H-1,4-diazepin-1-il)-propanoato de (2S)-t-butilo (49)

Prepara-se o composto 49 do esquema 5 esboçado anteriormente, como se segue:

a) 2,2-dimetil-4,6-di-ona-5-benzil-1,3-dioxano (42)

Dissolveu-se ácido de Meldrum (14,4 g, 100 mmol) em 250 ml de metanol. Adicionou-se complexo borano-dimetilamina, $(\text{CH}_3)_2\text{NH} \cdot \text{BH}_3$, (6,04 g, 102,5 mmol), seguido por 20 ml de benzaldeído (20,88 g; 196,8 mmol). Manteve-se a mistura reaccional em agitação vigorosa, seguida pela adição de 10 ml de benzaldeído. Verteu-se a mistura reaccional para 600 ml de água gelada e acidificou-se com ácido clorídrico concentrado. Após repouso



durante alguns minutos, formou-se um precipitado branco. Recolheu-se o precipitado num funil de vidro sinterizado e secou-se sob vácuo durante a noite para dar o composto (42) (22,4 g, 96%). ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,30 (s, 5H), 3,80 (t, 1H), 3,47 (d, 2H); 1,67 (s, 3H), 1,47 (s, 3H).

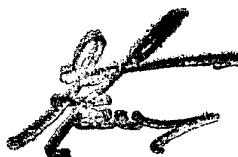
b) 2-benzilmalonato de benzilo (43).

Dissolveu-se o ácido de Meldrum benzilado (42) (22,40 g, 95,6 mmol) em tolueno. Adicionou-se álcool benzílico (20 ml; 20,9 g; 193,3 mmol) e aqueceu-se a mistura reaccional ao refluxo durante a noite. Evaporou-se a mistura reaccional e retomou-se em solução de carbonato de sódio 1N e extractou-se com éter (2x). Acidificou-se a solução e extractou-se com éter (2x). Secou-se o éter sobre sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se para dar o composto (43), um óleo cor de âmbar (20,9, 77%). ^1H RMN (CDCl_3) δ 10,97 (s, 1H), 7,27-7,20 (m, 10H), 5,10 (s, 2H), 4,77 (t, 1H), 3,27 (d, 2H).

c) éster t-butílico de N-benziloxicarbonil,N-(2-oxoetil)-(S)-alanina (44)

Dissolveu-se benziloxicarbonil-L-alanina (15,0 g) (67,2 mmol) em cloreto de metileno com cerca de 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Adicionou-se isobutileno por meio de uma ratoeira de dedo frio, de gelo seco. Deixou-se a solução aquecer até à temperatura ambiente e deixou-se em agitação durante a noite. Carregou-se a solução com isobutileno novamente e deixou-se em agitação durante a noite. Extractou-se a solução com bicarbonato de sódio aquoso 0,8N, secou-se sobre sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se sob vácuo para dar o éster t-butílico de benziloxicarbonil-L-alanina. ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,35 (s, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,23 (m, 2H), 1,45 - 1,30 (s/d, 12H).

Dissolveu-se o éster t-butílico de benziloxicarbonil-L-alanina (10,0 g, 35,8 mmol) em THF seco. Adicionou-se iodeto de alilo (7,4 ml, 78,8 mmol) seguido por hidreto de sódio (1,80 g, 45,0 mmol). Deixou-se a mistura reaccional em agitação à temperatura ambiente durante a noite. Evaporou-se a mistura reaccional e retomou-se em acetato de etilo. Extractou-se com água e tratou-se



com metabissulfito de sódio. Extractou-se o acetato de etilo com carbonato de sódio aquoso 1N, secou-se sobre sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se sob vácuo. Cromatografou-se o produto bruto por cromatografia flash (sílica gel, hexano seguido por hexano:acetato de etilo 95:5) para dar o éster t-butílico de N-benziloxicarbonil,N-alil-L-alanina (6,8 g, 60%). ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,33 (s, 5H), 6,17-5,67 (m, 1H), 5,20 (d, 4H), 1,75-1,70 (s/d, 12H).

Dissolveu-se o éster t-butílico de N-benziloxicarbonil,N-alil-L-alanina (6,8 g, 21,37 mmol) em metanol. Arrefeceu-se a solução num banho de acetona/gelo seco. Fez-se borbulhar ozono através da solução durante cerca de 20 min até a solução ficar com uma cor azul clara. Adicionou-se dimetilsulfito (3,6 ml, 3,34 g, 48,9 mmol) após a solução ter sido arejada com árgon. Cromatografou-se a mistura reaccional por cromatografia flash (sílica gel, hexano:acetato de etilo 95:5) para dar o produto do título (44) (6,1 g, 89%). ^1H RMN (CDCl_3) δ 9,67 (s, 1H), 7,35 (s, 5H), 5,20 (s, 2H), 5,07-4,60 (m, 1H), 3,97 (s, 2H), 1,77-1,67 (s/d, 12H).

d) hidrocloreto da amida de (R)-alanina (45)

Dissolveu-se Boc-D-Alanina (5,0 g) (26,43 mmol) em THF seco (100 ml). Adicionou-se trietilamina (4 ml), 2,91 g, 28,76 mmol), seguida por cloroformato de etilo (2,5 ml, 2,951 g, 27,19 mmol). Deixou-se a solução em agitação num banho frio de tetracloreto de carbono/gelo seco durante cerca de 30 min. Adicionou-se hidróxido de amónio concentrado (5 ml, 74,0 mmol) e armazenou-se a solução no refrigerador durante a noite. Evaporou-se a mistura reaccional sob vácuo e retomou-se o resíduo em acetato de etilo. Extractou-se o acetato de etilo com carbonato de sódio e água, secou-se sobre sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se. Tratou-se o resíduo com ácido clorídrico saturado/dioxano durante 1 h à temperatura ambiente. Evaporou-se o dioxano sob vácuo, retomou-se o resíduo numa pequena quantidade de metanol e precipitou-se com éter dietílico para dar o composto do título (45) (2,5 g, 76%).

e) éster t-butílico de N-benziloxicarbonil,N-(2-[(1R)-1-amino-carboniletíl]aminoetíl)-(S)-alanina (46)

Dissolveu-se o hidrocloreto da amida de D-alanina (45) (2,5 g) (20,18 mmol) em metanol, seguido pelo aldeído (44) (3,30 g, 10,27 mmol) e trietilamina (1,40 ml, 1,0 g, 10,07 mmol). Adicionou-se cianoboro-hidreto de sódio (0,86 g, 13,7 mmol) e manteve-se a solução em agitação à temperatura ambiente durante a noite. Evaporou-se a solução sob vácuo. Retomou-se o resíduo em clorofórmio:metanol (98:2) e cromatografou-se por cromatografia flash com sílica gel para dar o produto do título (46): (2,48 g, 61%). ^1H -RMN CDCl_3 δ 7,33 (s, 5H), 6,00 (s largo, 1H), 5,20 (d, 2H), 4,67-3,00 (m, 4H), 2,77 (t, 2H), 1,83-1,23 (s/m, 13 H).

f) éster t-butílico de N-carbobenziloxi,N-[2-(N'-[(1R)-1-amino-carboniletíl], N'-[2-benziloxicarbonil-2-benzil-1-oxo-etyl]aminoetíl)-(S)-alanina (47)

Dissolveu-se 2-benzilmalonato de benzilo (43) (6 g, 21,1 mmol) em tolueno e cloreto de oxalilo em excesso. Manteve-se a mistura reaccional em agitação num banho de óleo mantido a cerca de 35°C durante a noite. Evaporou-se a mistura reaccional e secou-se o resíduo sob vácuo para dar o cloreto de ácido de 2-benzilmalonato de benzilo. ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,23-7,17 (m, 10H), 5,07 (s, 2H), 4,10 (t, 1H), 3,23 (d, 2H).

Dissolveu-se a amina secundária (46) (2,48 g, 6,3 mmol) em clorofórmio. Adicionou-se piridina (1,10 ml, 1,08 g, 13,65 mmol), seguida pelo cloreto de ácido (3,9 g, 12,9 mmol) em tolueno. Deixou-se a mistura reaccional em agitação à temperatura ambiente durante a noite. Evaporou-se a mistura reaccional sob vácuo e retomou-se o resíduo em acetato de etilo. Extractou-se com bicarbonato de sódio aquoso 0,8N (2x), ácido clorídrico aquoso 1,0N (2x) e salmoura (1x). Secou-se sobre sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se. Cromatografou-se o resíduo (sílica gel, hexano:acetato de etilo 9:1 seguido por acetato de etilo puro) para dar o produto do título (47): (1,6 g, 40%): ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,37 (s/m), 5,20 (m), 3,67-3,00 (m), 1,57-1,00 (m).

g) 2-(5,7-dioxo-6-benzil-4-[(1R)-1-aminocarbonil-etyl]-hexa-hidro-1H,4H-1,4-diazepin-1-il)-propanoato de (2S)-t-butilo (48)

Dissolveu-se o éster t-butílico de N-carbobenziloxi,N-[2-[(N'-(1R)-1-aminocarboniletil,N'-(2-benziloxicarbonil-2-benzil-1-oxo-etyl)aminoethyl]-S)-alanina (47) (1,6 g, 2,51 mmol) em metanol e transferiu-se para um vaso Parr. Adicionou-se cerca de 1 g de 10% de paládio sobre carbono e colocou-se o vaso no dispositivo Parr com cerca de $3,45 \times 10^5$ Pa (50 Psi) de H_2 . Quando terminou a reacção, removeu-se o paládio sobre o carbono por filtração através de Celite^R e evaporaram-se os solventes sob vácuo e secou-se o resíduo sob vácuo. Dissolveu-se o resíduo em dimetilformamida (500 ml) e arrefeceu-se num banho de acetona/gelo seco a -78°C. Adicionou-se difenilfosforilamida (1,1 ml; 1,4 g; 5,1 mmol), seguida por bicarbonato de sódio sólido (1,05 g, 12,55 mmol). Manteve-se a solução em agitação a -78°C durante cerca de 1 h e armazenou-se no refrigerador. Após 3 dias, evaporou-se a dimetilformamida sob vácuo e secou-se o resíduo sob vácuo. Dissolveu-se o resíduo em clorofórmio e cromatografou-se por cromatografia flash (sílica gel, clorofórmio:metanol 97:3) para dar o produto do título (48) (86 g, 82%). 1H RMN ($CDCl_3$) δ 7,60 (s), 6,00 (s largo), 5,5-3,0 (m), 1,72-1,17 (s/m); EM (DCI/NH_3) ($M+H$)⁺ 418.

h) 2-(5,7-dioxo-6-benzil-4-[(1R)-1-benziloxicarbonilalanil]amino-etyl)-hexa-hidro-1H,4H-1,4-diazepin-1-il)-propanoato de (2S)-t-butilo (49)

Dissolveu-se a amida primária ciclizada (48) (204,5 mg, 0,49 mmol) em 5 ml de acetonitrilo:água (4:1) e agitou-se à temperatura ambiente. Adicionou-se [bis(trifluoroacetoxi)iodo]benzeno (0,31 g, 0,72 mmol) e manteve-se a mistura reacional em agitação à temperatura ambiente, sob árgon. Após 5 h, removeu-se a barra de agitação e lavou-se com metanol. Removeram-se os solventes sob vácuo. Diluiu-se o resíduo com ácido clorídrico aquoso 1N e evaporou-se sob vácuo. Lavaram-se os conteúdos com metanol e evaporaram-se sob vácuo. Deixou-se o sal hidrocloreto da amina a secar sob vácuo durante a noite. Dissolveu-se N-carbobenziloxi-alanina (0,29 g, 1,3 mmol) em cloreto de metileno seguida por diciclohexilcarbodiimida (1,0 M/ CH_2Cl_2 ; 0,65 ml). Deixou-se a mistura



reaccional em agitação durante cerca de 1 h à temperatura ambiente. Retirou-se por filtração a diciclo-hexilureia precipitada e evaporou-se o filtrado sob vácuo. Retomou-se o anidrido simétrico resultante em DMF e adicionou-se à amina bruta. Adicionou-se N--metilmorfolina (54 μ l, 50 mg, 0,49 mmol) e deixou-se a mistura reaccional em agitação à temperatura ambiente durante a noite. Evaporou-se a DMF sob vácuo e dissolveu-se o resíduo em clorofórmio:metanol (97:3) e cromatografou-se por cromatografia flash sobre sílica gel para dar o composto (49). 1 H RMN (CDCl₃) δ 7,33 (m), 6,73 (s largo), 5,3-3,0 (m), 1,67-1,0 (m); EM (DCI/NH₃) (M+H)⁺ 594.

Exemplo 12

Preparação do éster metílico de (2R)-2-[(1R)-1-(N-t-butiloxi-carbonilalanil)amino-etyl]-3-benzil-4-hidroxi-2,3,4,5,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-5-il]-1-oxo-propil-valinil-valina (67)

Prepara-se o composto 67 do esquema 6 anterior como se segue:

a) (4R)-3-(4-metoxi)fenilacetil-4-benzil-2-oxazolidinona (51)

Adiciona-se cloreto de oxalilo (50 ml) a uma solução de ácido 4-metoxifenilacético (50 g) em tolueno seco (10 ml) e agita-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 16 h. Evapora-se então a mistura reaccional até à secura e re-evapora-se em tolueno várias vezes para remover qualquer cloreto de oxalilo em excesso. Adiciona-se em seguida o cloreto de ácido bruto resultante a uma solução do sal de lítio de (R)-4-benzil-2-oxazolidinona a -78°C (preparado a partir de uma solução de (R)-4-benzil-2-oxazolidinona (60 g) em THF seco (700 ml) à qual se adiciona uma solução de n-butil-lítio (130 ml, 2,5N em n-hexano) a -78°C com agitação durante 10 min). Após agitação durante mais 1 h a -78°C, extinguiu-se a reacção com NH₄Cl saturado, extractou-se com acetato de etilo, lavou-se com NaCl saturado, secou-se sobre MgSO₄ e evaporou-se. Obtém-se o produto (51) por cristalização em acetato de etilo e n-hexano.

b) (4R)-3-[(2R)-2-metil-2-(4-metoxifenil)-1-oxo-etyl]-4-benzil-2-oxazolidinona (52)

A uma solução agitada da amida (51) anterior em THF seco (500 ml) a -78°C sob Ar, adiciona-se uma solução de bis-trimetilsililamida de lítio (1,05 equivalentes, 1N em THF). Após agitação durante 15 min, adiciona-se iodeto de metilo (1,6 equivalentes) de uma vez. Agita-se a mistura reaccional durante 1 h a -78°C, depois deixa-se aquecer até 0°C durante 1 h. Extingue-se então a reacção com NH₄Cl saturado, extracta-se com acetato de etilo, lava-se com NaCl saturado, seca-se sobre MgSO₄ e evapora-se. Obtém-se o produto (52) por cromatografia flash (sílica gel eluída com acetato de etilo a 20%/n-hexano) e então recristaliza-se para remover qualquer quantidade vestigial do outro diastereómero.

c) (2R)-2-metil-2-(4-metoxi)feniletanol (53)

Dissolve-se a amida (52) anterior em THF e trata-se a 0°C com uma solução de LiAlH₄ em THF (1,5 equivalentes). Após se completar a reacção (tlc), trata-se a mistura reaccional com água, NaOH 3N (aquoso) e água e filtra-se o resíduo, seca-se sobre MgSO₄ e evapora-se a pressão reduzida. Purifica-se o resíduo por cromatografia flash para dar o álcool (53) opticamente puro.

d) 4-[(1R)-1-benziloximetiletil]-6-oxo-hex-3-(Z)-enoato de metilo (56)

Condensa-se amoníaco líquido (520 ml) num balão de três tubuladuras o qual se equipou com um dedo frio e um agitador superior e se mantém a -78°C com um banho de gelo seco/isopropanol. Adiciona-se uma solução do composto (53) em tetra-hidrofurano (140 ml) ao balão reaccional seguido pela adição de pequenos pedaços de arame de lítio (4,5 equivalentes) durante um período de cerca de 15 min. Agita-se a mistura reaccional durante mais 30 min a -78°C e então extingue-se a reacção por adição lenta de etanol absoluto (400 ml). Após a reacção estar completamente extinta (cor branca), deixa-se aquecer até à temperatura ambiente durante a noite. Isto permite que a maior parte do NH₃ evapore. Submete-se o resíduo a partição entre água e éter dietílico, recolhe-se a camada orgânica, seca-se sobre MgSO₄ anidro, filtra-se e evapora-se a pressão reduzida. Dissolve-se o resíduo, que ainda contém alguma água, em cloreto de metileno, seca-se sobre MgSO₄

anidro, filtra-se e evapora-se a pressão reduzida para dar o composto (54) bruto que se utiliza no passo seguinte sem purificação adicional.

Dissolve-se o dieno (54) bruto anterior em THF e trata-se com NaH (1,05 equivalentes, dispersão em óleo a 60%) a 0°C seguido pela adição lenta de brometo de benzilo (1,2 equivalentes). Aquece-se então a mistura reaccional ao refluxo até a reacção estar completa. Após arrefecimento, trata-se a mistura reaccional com água e extracta-se com acetato de etilo. Evaporam-se os extractos orgânicos combinados a pressão reduzida para dar o composto (55) bruto que se utiliza no passo seguinte sem purificação adicional.

Dissolve-se aproximadamente 164 mmol do dieno (55) bruto anterior numa mistura de metanol e diclorometano (4:1, 500 ml), arrefece-se a solução resultante a -78°C e trata-se com O₃ até o dieno desaparecer por tlc. Reduz-se então a mistura reaccional com sulfureto de metilo (25 ml) e leva-se lentamente até à temperatura ambiente, temperatura à qual se agita durante 18 h. Evapora-se a mistura reaccional a pressão reduzida e purifica-se o resíduo por cromatografia flash para dar o composto (56) puro.

e) 4-[(1R)-1-benziloximetiletíl]-6-[(1R)-1-butiloxicarboniletíl]-amino-hex-3-(Z)-enoato de metilo (57)

Dissolve-se HCl.H-D-Ala-OtBu (1,5 equivalentes) em metanol e trata-se com NaOAc (1,5 equivalentes) seguido, em 5 min, pelo aldeído (56) (1 equivalente) e NaBH₃CN (1 equivalente). Agita-se a mistura reaccional durante 1 h à temperatura ambiente e então evapora-se a pressão reduzida. Retoma-se o resíduo em acetato de etilo, lava-se com água, seca-se sobre MgSO₄ e evapora-se. Purifica-se o resíduo por cromatografia flash para dar o aminodiéster (57) puro.

f) 1-[(1R)-1-butiloxicarbonil-etyl]-5-[(1R)-1-benziloximetil-etyl]-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-2-ona (58)

Dissolve-se a amina (57) anterior (1 equivalente) em dioxano e trata-se a solução resultante com NaOH 1N (1,5 equivalentes,

[Handwritten signature]

aguoso) à temperatura ambiente durante 4 h. Trata-se então a mistura reaccional com HCl 3N (aguoso) e evapora-se sob alto vácuo. Re-evapora-se o resíduo em tolueno (2x) e dissolve-se o hidrocloreto do aminoácido resultante em N,N-dimetilformamida seca. Arrefece-se a solução resultante a 0°C e trata-se sequencialmente com trietilamina (3 equivalentes), e DPPA (2 equivalentes). Leva-se lentamente a mistura reaccional à temperatura ambiente (durante 1 dia) e então agita-se durante mais 2 dias, Após este tempo, evapora-se a mistura reaccional sob alto vácuo e purifica-se o resíduo por cromatografia flash para dar o composto (58).

g) 1-[(1R)-1-butiloxicarbonil-etyl]-3-benzil-5-[(1R)-1-benziloximetil-etyl]-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-2-ona (59)

Dissolve-se o intermediário (58) (1 equivalente) em tetra-hidrofuran e arrefece-se a -78°C. Trata-se a mistura reaccional resultante com 1,1 equivalentes de uma solução 1 M de bis(trimetilsilil)amida de lítio em tetra-hidrofuran e agita-se durante 20 min Adiciona-se brometo de benzilo (2 equivalentes), continua-se a reacção a -78°C durante 10 min e então aquece-se a 0°C (remove-se o banho de gelo seco/isopropanol). Após a mistura reaccional atingir 0°C, adiciona-se NH₄Cl a 10% (aguoso) e extracta-se a mistura resultante com acetato de etilo. Secam-se as fracções orgânicas combinadas sobre MgSO₄ anidro, filtram-se e evaporam-se a pressão reduzida. Purificou-se o resíduo utilizando cromatografia flash para dar uma mistura de diastereómeros (59).

h) 1-[(1R)-1-aminocarbonil-etyl]-3-benzil-5-[(1R)-1-benziloximetil-etyl]-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-2-ona (60)

Tratam-se os ésteres (59) com TFA à temperatura ambiente durante 2 h. Evapora-se a mistura reaccional e então evapora-se em tolueno (2x). Dissolve-se o resíduo em THF, arrefece-se a -10°C e trata-se com 2,5 equivalentes de N-metilmorfolina e 1,5 equivalentes de cloroformato de etilo e agita-se a -10°C durante 30 min. Nesta altura, adiciona-se uma solução de NH₄OH em THF e aquece-se lentamente a mistura reaccional a 0°C durante 1 h. Vertete-se então a mistura reaccional em HCl 3N (aguoso) gelado e extracta-se com acetato de etilo. Evaporam-se os extractos orgânicos combinados a pressão reduzida e purifica-se o resíduo por

[Handwritten signature]

cromatografia flash para dar uma mistura de diastereómeros (60).

i) 1-[(1R)-1-(N-t-butiloxicarbonilalanil)amino-etyl]-3-benzil-5-[(1R)-1-benziloximetil-etyl]-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-2-ona (61)

Dissolve-se a amida (60) em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1) e trata-se com [bis(trifluoroacetoxy)iodo]benzeno (1,2 equivalentes) à temperatura ambiente durante 4 h. Evapora-se a solução a pressão reduzida e então evapora-se 2x em tolueno. Dissolve-se o resíduo em DMF e trata-se com Et_3N (1,2 equivalentes, pH=8) seguida por $(\text{Boc-Ala})_2\text{O}$ (3 equivalentes) e agita-se a mistura resultante durante a noite à temperatura ambiente. Evapora-se a mistura reaccional a pressão reduzida e purifica-se o resíduo por chromatografia flash para dar os diastereómeros 61a e 61b.

j) 1-[(1R)-1-(N-t-butiloxicarbonilalanil)amino-etyl]-3-benzil-4-hidroxi-5-[(1R)-1-benziloximetil-etyl]-hexa-hidro-1H-azepin-2-ona (62)

Dissolve-se um único isómero do retropéptido (61) em THF e trata-se a 0°C com t-hexilborano (0,5 M em THF, 1,05 equivalentes) e agita-se à temperatura ambiente até todo o composto (61) desaparecer (tlc). Trata-se então a mistura reaccional com peróxido de hidrogénio alcalino para dar, após tratamento extractivo, o álcool (62) bruto na forma de uma mistura de diastereoisómeros na posição 4 que se separa por chromatografia em coluna.

Repete-se esta reacção sobre o outro isómero na posição 3 do composto 61 para dar dois isómeros adicionais do composto 62.

k) 1-[(1R)-1-(N-t-butiloxicarbonilalanil)amino-etyl]-3-benzil-4-(t-butildimethylsilyl)oxi-5-[(1R)-1-benziloximetil-etyl]-hexa-hidro-1H-azepin-2-ona (63)

Dissolve-se um único isómero do álcool (62) em DMF e trata-se com imidazolo (2 equivalentes) e cloreto de t-butildimethylsilyl (1,05 equivalentes) à temperatura ambiente durante a noite. Verte-se a mistura reaccional em água e extracta-se com acetato de etilo. Secam-se os extractos orgânicos combinados sobre MgSO_4 e evaporam-se a pressão reduzida. Purifica-se o resíduo por cro-



matografia flash para dar o composto (63).

Repete-se o mesmo procedimento sobre os outros três isómeros do composto 62 para dar os correspondentes isómeros do composto 63.

1) 1-[(1R)-1-(N-t-butiloxicarbonilalanil)amino-etyl]-3-benzil-4-(t-butildimethylsilyl)oxi-5[(1R)-1-carboxietil]-2,3,4,5,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-2-ona (65)

Dissolve-se um único diastereómero do álcool protegido (63) em MeOH juntamente com Pd a 5%/C e trata-se com H₂ num dispositivo Parr até cessar a admissão de H₂. Remove-se o catalisador por filtração através de Celite^R e evapora-se a mistura reacional para dar o álcool (64) bruto que se utiliza no passo seguinte sem purificação adicional.

Dissolve-se o álcool (64) resultante em acetona e arrefece-se a mistura resultante a 0°C. Adiciona-se reagente de Jones (2,5 equivalentes) e continua-se a reacção durante 1 h. Nesta altura destrói-se qualquer excesso de reagente de Jones pela adição de isopropanol e evapora-se a mistura. Dissolve-se o resíduo em acetato de etilo, lava-se com água, seca-se sobre MgSO₄ e evapora-se a pressão reduzida. A purificação por cromatografia flash dá o ácido (65).

Repete-se então o mesmo procedimento sobre os outros três isómeros do composto 63 para dar os correspondentes ácidos diastereoméricos (65).

m) éster metílico de (2R)-2-(1-[(1R)-1-(N-t-butiloxicarbonilalanil)amino-etyl]-3-benzil-4-(t-butildimethylsilyl)oxi-hexahidro-1H-azepin-5-il)-1-oxo-propil-valinil-valina (66)

Dissolve-se um isómero do ácido (65) em DMF e trata-se sequencialmente com HCl.H-Val-Val-OMe (2 equivalentes), HOEt (2 equivalentes), N-metilmorfolina (6 equivalentes) e reagente Bop (2 equivalentes) e agita-se a mistura reacional à temperatura ambiente durante a noite. Remove-se o solvente sob vácuo e purifica-se o resíduo por cromatografia flash. Converte-se o grupo

carboxi em Cbz-NH o qual se converte em Boc-Ala-NH pelo procedimento do exemplo 9.

Repete-se então o mesmo procedimento sobre os outros três isómeros do composto 65 para dar os correspondentes diastereômeros do composto 66.

n) éster metílico de (2R)-2-(1-[(1R)-1-(N-t-butiloxicarbonilalanil)amino-etyl]-3-benzil-4-hidroxi-hexa-hidro-1H-azepin-5-il)-1-oxo-propil-valinil-valina (67)

Dissolve-se um isómero do álcool protegido (66) em THF e trata-se com n-Bu₄NF (1M em THF, 2 equivalentes) à temperatura ambiente. Após todo o éter ter desaparecido (tlc), evapora-se a mistura reaccional a pressão reduzida e purifica-se o resíduo por cromatografia flash para dar o composto do título (67).

Repete-se então o mesmo procedimento sobre os outros três isómeros do composto 66 para dar os correspondentes produtos diastereoméricos do composto (67).

Exemplo 13

Preparação do éster metílico de (2S)-2-(3-benzil-4-[(1R)-1-(benziloxicarbonil-alanilamino)-etyl]-5-oxo-6-benzil-hexa-hidro-1H, 4H-1,4-diazepin-1-il)-3-fenil-1-oxo-propil-valinil-valina (84)

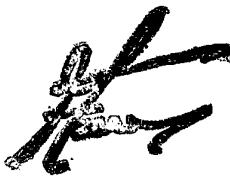
Prepara-se o composto 84 do esquema 7 anterior como se segue:

a) éster t-butílico de N-alil-D-alanina (69)

Trata-se o éster t-butílico de D-alanina (68) com um equivalente de brometo de alilo e um equivalente de trietilamina em tolueno sob refluxo. Evapora-se o solvente e purifica-se o produto por cromatografia flash sobre sílica gel para dar o composto (69).

b) éster t-butílico de N-benziloxicarbonil-N-alil-D-alanina (70)

Trata-se o éster t-butílico de N-alil-D-alanina (69) com 1,1 equivalentes de cloroformato de benzilo e 1,1 equivalentes de trietilamina em cloreto de metileno à temperatura ambiente duran-



te a noite. Após evaporação do solvente, purifica-se o produto por cromatografia sobre sílica gel para dar o composto (70).

c) éster t-butílico de N-benziloxicarbonil-N-(2-oxoetil)-D-alanina (71).

Trata-se o éster t-butílico de Cbz-N-alil-D-alanina (70) em cloreto de metileno com ozono a -78°C até persistir uma cor azul. Extingue-se o azonido com sulfurato de dimetilo e deixa-se aquecer até à temperatura ambiente. Remove-se o excesso de sulfureto de dimetilo fazendo borbulhar uma corrente de azoto na solução. Após evaporação do solvente purifica-se o produto por cromatografia flash sobre sílica gel para dar o composto (71).

d) éster t-butílico de N-benziloxicarbonil,N-(2-(N'-(1S)-2-fenil-1-metoxicarbonil-etyl)amino)-etyl)-D-alanina (72)

Trata-se o éster t-butílico de N-Cbz-N-(2-oxoetil)-D-alanina (71) com éster metílico de fenilalanina e cianoboro-hidreto de sódio em metanol tamponado com acetato de sódio. Após evaporação do solvente purifica-se o produto por cromatografia flash sobre sílica gel para dar o composto (72).

e) 2,2-dimetil-4,6-dioxo-5-benzil-1,3-dioxano (74)

Trata-se o ácido de Meldrum (73) com benzaldeído na presença de complexo de borano-trietilamina em tolueno. Isola-se o produto por cromatografia flash sobre sílica gel para dar o composto (74).

f) 2-benzilmalonato de benzilo (75)

Mantém-se o 2,2-dimetil-4,6-dioxo-5-benzil-1,3-dioxano (74) ao refluxo com álcool benzílico. Dilui-se a mistura reaccional com acetato de etilo e extracta-se com NaHCO_3 1N. Acidificam-se os extractos aquosos até pH 2,0 com NaHSO_4 sólido e então extractam-se com acetato de etilo. Após secagem sobre Na_2SO_4 , evapora-se o acetato de etilo e purifica-se o produto por cromatografia flash sobre sílica gel para dar o composto (75).

g) ácido 3-hidroxi-2-benzil-propanóico (76)

Trata-se o 2-benzilmalonato de benzilo (75) com hidreto de

alumínio e lítio em THF a -78°C. Deixa-se a mistura reaccional aquecer até à temperatura ambiente e então extingue-se a reacção com HCl aquoso. Dilui-se a mistura reaccional com água e extracta-se com acetato de etilo. Após secagem sobre Na_2SO_4 , evapora-se o acetato de etilo e purifica-se o produto por cromatografia flash sobre sílica gel para dar o composto (76).

h) ácido 3-(t-butildimethylsilyl)oxi-2-benzil-propanóico (77)

Trata-se o ácido 3-hidroxi-2-benzilpropiónico (76) com excesso de cloreto de t-butil-dimethylsilyl e uma quantidade equivalente de imidazolo em dimetilformamida à temperatura ambiente durante a noite. Após remoção do solvente, dissolve-se o resíduo em acetato de etilo e extracta-se com NaHSO_4 1N. Seca-se o acetato de etilo sobre Na_2SO_4 e evapora-se para dar o bis-silil-éster-éter bruto, o qual se purifica por cromatografia flash sobre sílica gel.

Agita-se então o bis-silil-éster-éter em ácido acético glacial durante uma hora à temperatura ambiente. Após evaporação do solvente, purifica-se o produto por cromatografia flash sobre sílica gel para dar o composto (77).

i) 3-(t-butildimethylsilyl)oxi-2-benzilpropanoato de benzilo (78)

Dissolve-se o ácido 3-(t-butildimethylsilyl)oxi-2-benzilpropanóico (77) em cloreto de metileno e trata-se com 3 equivalentes de cada um de diciclo-hexilcarbodiimida, 4-(N,N-dimetilamino)piridina e álcool benzílico, à temperatura ambiente durante a noite. Filtra-se a mistura reaccional e dilui-se o filtrado com cloreto de metileno e extracta-se com NaHCO_3 1N. Seca-se a camada orgânica sobre Na_2SO_4 , evapora-se até à secura e purifica-se o produto resultante por cromatografia flash sobre sílica gel.

j) 3-oxo-2-benzilpropanoato de benzilo (79)

Trata-se o 3-(t-butildimethylsilyl)oxi-2-benzilpropanoato de benzilo (78) com fluoreto de tetrabutilamónio em cloreto de metileno durante uma hora à temperatura ambiente. Lava-se a mistura reaccional com NaHSO_4 1N e água, seca-se depois sobre Na_2SO_4 .



Dissolve-se o álcool bruto resultante em dimetilsulfóxido seco e trata-se com 3 equivalentes de trietilamina e 3 equivalentes de complexo piridina. SO_3 à temperatura ambiente durante 10 min. Verte-se a mistura reacional em água fria, extracta-se com éter e lavam-se as camadas etéreas com NaHSO_4 1N, água e NaHCO_3 1N e secam-se sobre Na_2SO_4 . A evaporação do solvente produz o aldeído (79) bruto que se utiliza sem purificação adicional.

k) éster t-butilico de N-benziloxicarbonil,N-(2-(N'-(2-benziloxicarbonil-3-fenil-propil),N'-(1S)-2-fenil-1-metoxicarboniletil))-amino)-etil-D-alanina (80)

Dissolvem-se os compostos (72) e (79) em metanol tamponado com acetato de sódio e tratam-se com cianoboro-hidreto de sódio à temperatura ambiente durante a noite. Obtém-se o produto (80) por evaporação do solvente e purificação por cromatografia flash sobre sílica gel.

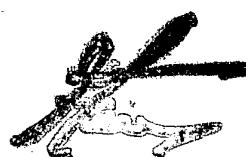
l) 6-benzil-4-[(1R)-1-t-butiloxicarbonil-etyl]-1-[(1S)-1-metoxicarbonil-2-fenil-etyl]-hexa-hidro-1H,4H-1,4-diazepin-5-ona (81)

Hidrogena-se o composto (80) sobre Pd a 10% sobre carbono em metanol. Retira-se o catalisador por filtração através de uma almofada de Celite® e evapora-se o filtrado até à secura para dar o aminoácido livre bruto.

Dissolve-se o aminoácido em dimetilformamida e trata-se com 1,1 equivalentes de difenilfosforilazida e 1,1 equivalentes de trietilamina a 4°C durante três dias. A evaporação do solvente e a purificação por cromatografia flash sobre sílica gel produz o produto ciclizado (81) puro.

m) 6-benzil-4-[(1R)-1-(benziloxicarbonil)amino-etyl]-1-[(1S)-1-metoxicarbonil-2-fenil-etyl]-hexa-hidro-1H,4H-1,4-diazepin-5-ona (82)

Trata-se o composto (81) com ácido trifluoroacético a 50% em cloreto de metileno à temperatura ambiente durante 1 h. A evaporação do solvente seguida por evaporação do resíduo em cloreto de metileno, três vezes, produz o ácido livre bruto.



Dissolve-se o ácido livre em tolueno e mantém-se em refluxo na presença de difenilfosforilazida e álcool benzílico durante a noite. Após evaporação do solvente e purificação por cromatografia flash sobre sílica gel obtém-se o composto (82).

n) éster metílico de (2S)-2-(3-benzil-4-[(1R)-1-(benziloxicarbonilamino)-etil]-5-oxo-6-benzil-hexa-hidro-1H,4H-1,4-diazepin-1-il)-3-fenil-1-oxo-propil-valinil-valina (83)

Saponifica-se o grupo éster metílico do composto (82) com base seguida por acoplamento com Val-Val-OMe utilizando BOP (hexafluorofosfato de benzotriazolo-1-iloxi-tris(dimetilamino)-fosfônio), N-metilmorfolina (NMM) e 1-hidroxi-benzotriazolo (HOBT) para dar o composto do título.

o) éster metílico de (2S)-2-(3-benzil-4-[(1R)-1-(benziloxicarbonilalanilamino)-etil]-5-oxo-6-benzil-hexa-hidro-1H,4H-1,4-diazepin-1-il)-3-fenil-1-oxo-propil-valinil-valina (84)

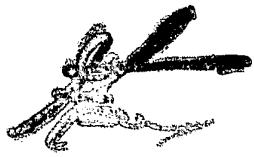
Remove-se o grupo benziloxicarbonilo por hidrogenação catalítica, então acopla-se o grupo amino resultante a Cbz-Ala usando BOP, HOBT e NMM para dar o composto do título.

Remove-se o grupo benziloxicarbonilo (Cbz) por hidrogenação catalítica para dar o éster metílico de (2S)-2-(1H,4H-3-benzil-4-[(1R)-1-(alanilamino)-etil]-5-oxo-6-benzil-hexa-hidro-1H,4H-1,4-diazepin-1-il)-3-fenil-1-oxo-propil-valinil-valina (85).

Exemplo 14

Composição de unidade de dosagem lipossómica

Dissolvem-se fosfatidilcolina (1,4 g) e fosfatidilglicerol (0,6 g) em 300 ml de um solvente de metanol a 20% em clorofórmio e evaporam-se até à secura. Adiciona-se uma solução do composto do exemplo 2 (30 mg em 200 ml de solução salina tamponada com fosfato) à película de fosfolípidos seca que se deixa equilibrar à temperatura ambiente durante 1-2 h. Agita-se em vórtex a dispersão de lipossomas formada para assegurar uma mistura uniforme. Extrude-se a suspensão resultante através de um filtro de policarbonato de 0,2 μ cinco vezes para produzir uma distribuição de tamanhos uniforme. Se necessário, pode-se



dialisar a suspensão ou ultra-centrifugar para remover o composto não capsulado.

Exemplo 15

Composição de unidade de dosagem lipossómica

Numa proveta, aqueceram-se colesterol (49 mg) e ácido oleíco (0,358 g) a 65°C durante 20-30 min. Mantendo a temperatura, adicionaram-se lentamente fosfolípidos (1 g), assegurando que o ácido oleíco os molhe completamente. Adiciona-se uma solução de arginina (0,22 g em 3,37 g de água) a 40°C, em pequenas alíquotas e mistura-se completamente na pasta. Mantém-se a mistura a 40°C. Após equilíbrio durante uma semana, mistura-se o composto do exemplo 8 (150 mg), completamente, no gel. Ajusta-se o pH a 7,0 com ácido acético, se necessário. Adiciona-se solução salina tamponada com fosfato (pH 7,4) em pequenas alíquotas com agitação em vórtex para se conseguir uma concentração de 200 mg de gel lipossómico por ml. Os lipossomas formam-se espontaneamente. Este procedimento produz 5 g de suspensão lipossómica. Uma unidade de dosagem padrão é 1 g de suspensão lipossómica.

Exemplo 16

Composição de unidade de dosagem parentérica

Prepara-se uma preparação que contém 25 mg de um composto deste invento como se segue: dissolve-se 25 mg do composto em 15 ml de água destilada. Filtra-se a solução sob condições estéreis para uma ampola de multi-doses de 25 ml e liofiliza-se. Reconstitui-se o pó por adição de 20 ml de dextrose a 5% em água (D5W) para injecção intravenosa ou intramuscular. Determina-se assim a dosagem pelo volume da injecção. Esta solução também é adequada para utilização em outros métodos de administração, tais como adição numa garrafa ou saco para infusão gota a gota i.v..

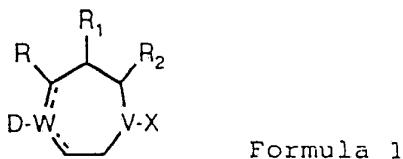
Exemplo 17

Composição de unidade de dosagem oral

Prepara-se uma cápsula para administração oral misturando e moendo 35 mg do composto do exemplo 8 com 75 mg de lactose e 5 mg de estearato de magnésio. Peneira-se o pó resultante e insere-se em cápsulas de gelatina dura.

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo de preparação de um composto de fórmula 1:



na qual:

D é A' ou $A \cdot B \cdot (Q)_a \cdot (G)_b \cdot NH$;

X é $\begin{array}{c} R_4 \\ | \\ CO \cdot (Y)_c \cdot (E)_d \cdot Z \end{array}$ ou $\begin{array}{c} R_4 \\ | \\ Z \end{array}$;

V e W são, independentemente um do outro, N ou C;
uma das ligações indicadas por — é uma ligação dupla e a
outra é uma ligação simples ou, quando W é N ambas — são
ligações simples;

R é hidrogénio ou OH, quando W é N, R é =O;

R_1 é alquilo C_{1-6} , $(CH_2)_n Ar$, $(CH_2)_n Het$, $(CH_2)_n CONHR'$,
 $(CH_2)_n OR'$ ou $(CH_2)_n SR'$;

R_2 é:

a) 2H, quando V é N;

b) OH, OR', =CHR' ou NHR' quando V é C;

c) =O quando V é N e D é $A \cdot B \cdot (Q)_a \cdot (G)_b \cdot NH$ e X
é $\begin{array}{c} R_4 \\ | \\ CO \cdot (Y)_c \cdot (E)_d \cdot Z \end{array}$ ou quando W e V são ambos N;

A' é hidrogénio, alquilo C_{1-6} , benzilo, halobenzilo, di-halobenzilo ou tosilo;

B é hidrogénio ou um grupo protector de amino;

Q é um D ou L aminoácido ou é uma ligação covalente;

G é Glx, Asx, Ala, β -Ala, Arg, Gly, Ile, Leu, Lys, Ser, Thr, Asp, His, Cys, Arg e Ala;

Y e E são, independentemente um do outro, um D ou L Val, Met ou His;

Y e E são, independentemente um do outro, um D ou L

aminoácido;

a, b, c e d são, independentemente um do outro, 0 ou 1;

Z é hidrogénio $(CH_2)_nOR'$, $(CH_2)_nNHR'$, alquilo C_{1-6} , $(CH_2)_nSR'$, $O(CH_2)_pOR'$, $NH(CH_2)_pOR'$, $O(CH_2)_pSR'$ ou $NH(CH_2)_pSR'$;

R_3 e R_4 são, independentemente um do outro, hidrogénio, alquilo C_{1-6} , $(CH_2)_nHet$, $(CH_2)_nAr$, $(CH_2)_nCONHR'$, $(CH_2)_nOR'$, $(CH_2)_nSR'$, $(CH_2)_nNHR'$, $CH(OH)CH_3$ ou $(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

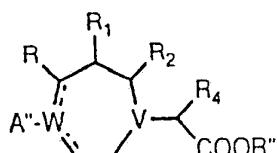
R' é hidrogénio, alquilo C_{1-4} ou benzilo;

n é 0 a 3;

p é 1 a 3;

Het é indolilo ou imidazolilo, ou piridilo ou tienilo opcionalmente substituídos com um ou dois alquilo C_{1-4} , OR' ou SR'; e

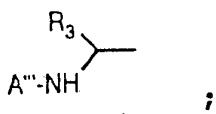
Ar é fenilo opcionalmente substituído com um ou dois alquilo C_{1-4} , OR', NO_2 , NH_2 , halogéneo, CF_3 ou SR'; caracterizado por compreender a reacção de um composto de fórmula 2:



Formula 2

na qual

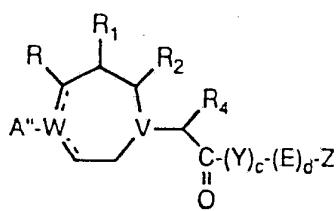
A'' é A' ou



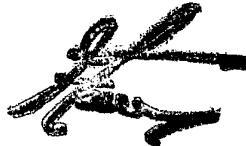
R'' é hidrogénio ou alquilo inferior; e
 A'''' é H ou um grupo protector de amino;
com um composto de fórmula 3:



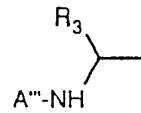
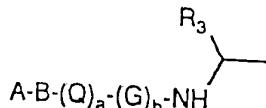
para originar um composto de fórmula 4:



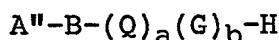
Formula 4



e, para preparar os compostos nos quais D é

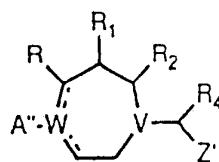


fazer reagir um composto de fórmula 4 no qual A" é com um composto de fórmula 5:



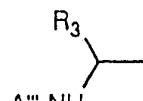
Fórmula 5

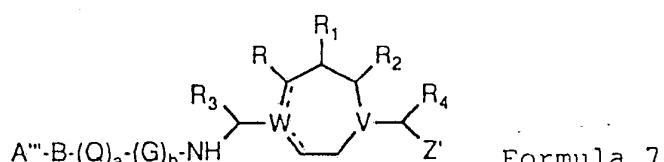
e, opcionalmente, remover o grupo protector de amino A"; ou converter um composto de fórmula 2 num composto de fórmula 6:



Formula 6

na qual Z' é Z, com quaisquer grupos protectores necessários, e

quando A" é  , fazer reagir um composto de fórmula 6 com A''-B-(Q)_a-(G)_b-H para se obter um composto de fórmula 7:



Formula 7

e, opcionalmente, remover o grupo A" e quaisquer grupos protectores em Z'.

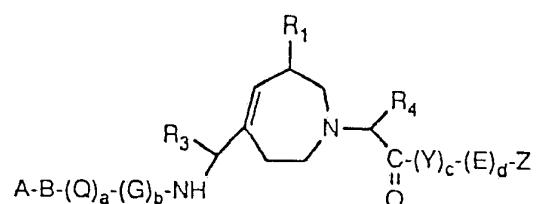
2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o grupo protector de amino em A ser t-butiloxicarbonilo, benziloxicarbonilo, p-clorobenziloxicarbonilo, 2,4-diclorobenziloxicarbonilo, alcanoílo ou tosilo.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o aminoácido em B ser Ala, β -Ala, Gly, Ile, Val, Leu, Met,

His, Lys, Arg, Glx, Asx, Cys, Ser ou Thr.

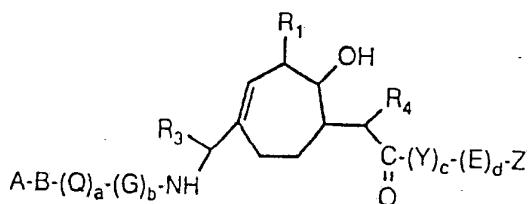
4 - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por um, pelo menos, de Y e E ser um aminoácido, igual ou diferente, seleccionado de entre Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Val, Arg, Lys, Thr, Ser, Cys, Glx e Asx.

5 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um composto que é representado pela fórmula:



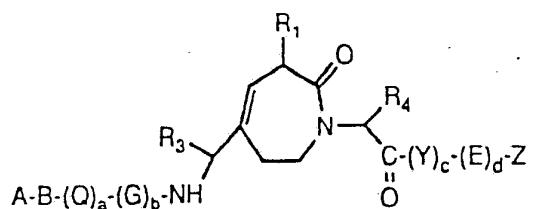
na qual R_1 , A, B, Q, G, Y, E, a, b, c, d, R_3 , R_4 e Z são definidos como na reivindicação 1.

6 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um composto que é representado pela fórmula:



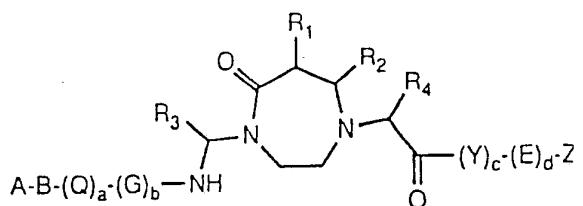
na qual R_1 , A, B, Q, G, Y, E, a, b, c, d, R_3 , R_4 e Z são definidos como na reivindicação 1.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um composto que é representado pela fórmula:



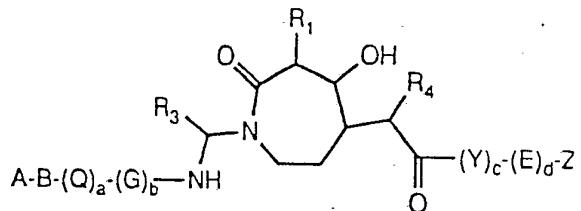
na qual R_1 , A, B, Q, G, Y, E, d, R_3 , R_4 e Z são definidos como na reivindicação 1.

8 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um composto que é representado pela fórmula:



na qual R_2 é 2H ou =0; e R_1 , A, B, Q, G, Y, E, a, b, c, d, R_3 , R_4 e Z são definidos como na reivindicação 1.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um composto que é representado pela fórmula:



na qual R_1 , A, B, Q, G, Y, E, a, b, c, d, R_3 , R_4 e Z são definidos como na reivindicação 1.

10 - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por se preparar um composto que é o éster metílico de 2-[3-benzil-5-(1-alanilaminoetil)-2,3,6,7-tetra-hidro-1H-azepin-1-il]-1-oxopropil-valinilvalina.

11 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por se preparar um composto que é o éster metílico de 2-(5-[(1S)-1-alanilaminoetil]-3-benzil-2-hidroxi-ciclo-hept-4-en-1-il)-1-oxo-etyl-valinilvalina.

12 - Processo de preparação de uma composição farmacêutica caracterizado por compreender misturar um composto de fórmula 1

73 396

SB CASE 14550

-74-

de acordo com a reivindicação 1 com um excipiente farmaceuticamente aceitável.

Lisboa,

25 Nov 1991

Por SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION

=O AGENTE OFICIAL=

