República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0413848-1 B1

(22) Data do Depósito: 26/08/2004

(45) Data de Concessão: 30/04/2019

(54) Título: COMPOSTO, PROCESSO PARA PREPARAR O COMPOSTO, COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA PARA PREVENIR INFLAMAÇÃO E APOPTOSE, PROCESSO PARA PREPARAR A COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA E USO DE COMPOSTO, OU DE SEU SAL, OU DE SEU ESTEREOISÔMERO

(51) Int.Cl.: C07D 261/04; A61P 29/00.

(30) Prioridade Unionista: 27/08/2003 KR 10-2003-0059451.

(73) Titular(es): LG CHEM, LTD.

(72) Inventor(es): HYE-KYUNG CHANG; YEON-SOO OH; CHEOL-WON PARK; YONG-JIN JANG; TAE-KYO PARK; SUNG-SUB KIM; MIN-JUNG KIM; MI-JEONG PARK; JUNG-GYU PARK; HEE-DONG PARK; KYEONG-SIK MIN; TAE-SOO LEE; SANG-KYUN LEE; SOO-HYEON KIM; HEE-KYUNG JEONG; SUN-HWA LEE; HWA-DONG KIM; AE-RI KIM; KI-SOOK PARK; HYUN-IK SHIN; HYEONG-WOOK CHOI; KYU-WOONG LEE; JAE-HOON LEE; TAE-HO HEO; HO-JUN KIM; TAE-SIK KWON.

(86) Pedido PCT: PCT KR2004002139 de 26/08/2004

(87) Publicação PCT: WO 2005/021516 de 10/03/2005

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/02/2006

(57) Resumo: "COMPOSTO, PROCESSO PARA PREPARAR O COMPOSTO, COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA PARA PREVENIR INFLAMAÇÃO E APOPTOSE, MÉTODO PARA PREVENIR INFLAMAÇÃO E APOPTOSE, E, USO DE COMPOSTO INIBIDOR DE CASPASE, OU DE SEU SAL, OU DE SEU ESTEREOISÔMERO". A presente invenção refere-se a um derivado de isoxazolina como um inibidor contra várias caspases, a um processo para preparar o mesmo, e a uma composição terapêutica para prevenir inflamação e apoptose compreendendo o mesmo.

"COMPOSTO, PROCESSO PARA PREPARAR O COMPOSTO, COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA PARA PREVENIR INFLAMAÇÃO E APOPTOSE, PROCESSO PARA PREPARAR A COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA E USO DE COMPOSTO, OU DE SEU SAL, OU DE SEU ESTEREOISÔMERO"

CAMPO TÉCNICO

A presente invenção refere-se a um derivado de isoxazolina como um inibidor contra várias caspases incluindo caspase-1 [enzima conversora de interleucina-1β, ICE] e caspase-3 [apopaína/CPP-32], a um processo para a preparação do mesmo, e a uma composição terapêutica para prevenir inflamação e apoptose compreendendo o mesmo.

FUNDAMENTOS

Caspase é um novo tipo de cisteína protease na forma de $\alpha_2\beta_2$ descoberta durante os últimos 10 anos. Têm sido conhecidos até agora cerca de 14 tipos. Caspase-1 (ICE), uma delas, é um tipo de citocinas e participa na conversão de prointerleucina-1β para ativar interleucina-1β. Interleucina-1 consiste de interleucina-1α e interleucina-1β, ambas as quais são sintetizadas em monócitos na forma de um precursor possuindo 31 kDa. Apenas prointerleucina-1β é ativada por ICE. As posições hidrolisadas por caspase-1 são Asp^{27}-Gly^{28} e Asp^{116}-Ala^{117}. A hidrólise da última posição dá interleucina-1β. Tem sido relatado que interleucina-1β atua como um mediador importante na provocação de inflamação (1, 3). Tem sido descoberto pela primeira vez em 1989, e em dois grupos de estudo independentes, a sua estrutura tridimensional que foi determinada pelo método cristalográfico de raios-X.

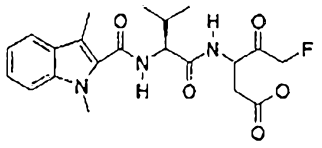
Caspase-3 (CPP-32) é amplamente estudada para seu papel ou mecanismo de ação, e sua estrutura tridimensional foi determinada em 1996 (2). Caspase-3 (apopaína) ativada de procaspase-3 hidrolisa o motivo (P4)-Asp-X-X-Asp(P1), e os substratos conhecidos incluem poli(ADP-ribose) polimerase, ribonucleoproteína nuclear pequena U1 de 70.000 Mr e catalisa

subunidade de proteína cinase dependente de DNA de 460.000 Mr, etc. A estrutura por raios-X de caspase-7 tem sido relatada como sendo muito semelhante àquela de caspase-3 (4).

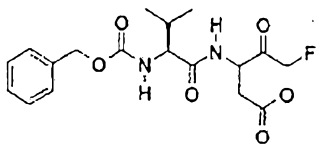
Caspases-8 e 9 estão presentes nas caspases-3,6,7 a montante, e sabe-se que estas caspases participam na cascata de apoptose. A estrutura por raios-X de caspase-8 foi determinada em 1999 (5), e particularmente os seus inibidores podem ser vantajosamente usados para tratar as doenças relacionadas com apoptose.

Inibidores de caspase significam aqueles compostos que inibem a atividade de caspase, e deste modo controlam tais sintomas como inflamação, apoptose, etc. causados pela atividade de caspase. Doenças e sintomas que podem ser tratados ou atenuados pela administração de inibidores incluem os seguintes: artrite reumatóide, síndrome inflamatória do intestino inflamado, doença de enxerto versus hospedeiro, sépsis, osteoartrite, osteoporose, leucemia mielógena aguda e crônica, meningite, salpingite, choque séptico, colangite, colete, encefalite, endocardite, glomerulonefrite, hepatite, miocardite, pancreatite, diabetes de tipo I, esclerose múltipla, mal de Alzheimer, doença de Parkinson, hepatocirrose (6).

Dentre os inibidores de caspase conhecidos até agora, os inibidores irreversíveis mais notáveis são os seguintes:



IDN-1965

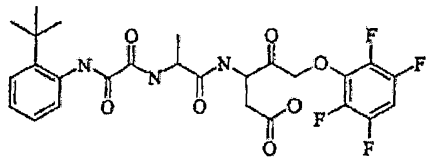


MX-1013

Ambos os inibidores acima exibem sua atividade baseado no mecanismo comum que eles irreversivelmente inativam a enzima para suprimir a apoptose celular (inibidor de amplo espectro, irreversível). Tem sido relatado que os inibidores irreversíveis possuem atividade inibitória muito mais efetiva quando se comparam os inibidores irreversíveis e reversíveis (7). É relatado que ambos

PT 1041348

IDN-1965 de IDUN Co. e MX-1013 de Maxim Co. mostram atividade em modelo de apoptose celular para lesão hepática (8, 9). Estes compostos estão agora no estágio de teste pré -clínico. O inibidor irreversível IDN-6556, cuja estrutura tem sido recentemente relatada, está agora no estágio de teste clínico de fase II como um agente terapêutico para lesão hepática (10, 11).



IDN-6556

Referências:

(1) *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 2nd ed., ed by Gallin, Goldstein e Snyderman. Raven Press Ltd., New York . 1992, pp211-232; Blood, 19%, 87(6), 2095-2147.

(2) Wilson, K. P. *et al*, *Nature*, 1994,370.270; Walker, N. P. C. *et al. Cell*, 1994, 78, 343; *Nature Structural Biology*, 1996, 3(7), 619.

(3) Thornberry, N. A. *et al*, *Nature*, 1992,356. 768; *Nature Biotechnology*, 1996, 14 , 297; *Protein Science*, 1995, 4, 3; *Nature*, 1995, 376(July 6), 37; *Protein Science*, 1995, 4, 2149.

(4) Wei, Y. *et al*, *Chemistry and Biology*, 2000, 7, 423.

(5) Blanchard H. *et al*, *Structure*, 1999, 7, 1125; Blanchard H. *et al*, *J. of Mol. Biol.*, 2000, 302, 9.

(6) Referências para doenças relacionadas com caspase:

Demência: *Arch Neurol* 2003 Mar;60(3):369-76, Caspase gene expression in the brain as a function of the clinical progression of Alzheimer disease. Pompl EN, Yemul S, Nang Z, Ho L, Haroutunian V, Purohit D, Mohs R, Pasinetti GM.

Derrame cerebral: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Nov 12;99(23):15188-93, Caspase activation and neuroprotection in caspase-3-deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose

deprivation. Le DA, Wu Y, Huang Z, Matsushita K, Plesnila N, Augustinack JC, Hyman BT, Yuan J, Kuida K, Flavell RA, Moskowitz MA.

Enfraquecimento cerebral devido à AIDS: *J Neurosci* 2002 May 15;22(10):4015-24, Caspase cascades in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. Garden GA, Budd SL, Tsai E, Hanson L, Kaul M, D'Emlia DM, Friedlander RM, Yuan J, Masliah E, Lipton SA.

Diabetes: *Diabetes* 2002 Jun;51(6):1938-48, Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ.

Úlcera gástrica: *J Physiol Pharmacol* 1998 Dec;49(4):489-500, Role of basic fibroblast growth factor in the suppression of apoptotic caspase-3 during chronic gastric ulcer healing. Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A.

Lesão cerebral por hepatite: *J Viral Hepat* 2003 Mar;10(2):81-6, Cerebral dysfunction in chronic hepatitis C infection. Forton DM, Taylor-Robinson SD , Thomas HC.

Insuficiência hepática fulminante: *Gastroenterology* 2000 Aug;119(2):446-60, Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, Ramakers J, Eckert K, Spengler U, Brenner D, Manns M, Trautwein C.

Sépsis: *Nat Immunol* 2000 Dec;1(6):496-501, Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, Xanthoudakis S, Roy S, Black C, Grimm E, Aspiotis R, Han Y, Nicholson DW, Karl IE.

Rejeição de transplante de órgão: *Xenotransplantation* 2001 May;8(2):115-24, In vitro prevention of cell-mediated xeno-graft rejection via the Fas/FasL-pathway in CrmA-transducted porcine kidney cells. Fujino M, Li XK, Suda T, Hashimoto M, Okabe K, Yaginuma H, Mikoshiba K, Guo L,

Okuyama T, Enosawa S, Amemiya H, Amano T, Suzuki S.

Artrite reumática: *Prog Med Chem* 2002;39:1-72, Caspase inhibitors as anti-inflammatory and antiapoptotic agents. Graczyk PP.

Doenças cardíacas isquêmicas: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 Sep;283(3):H990-5, Hypoxia-induced cleavage of caspase-3 and DFF45/ICAD in human failed cardiomyocytes. Todor A, Sharov VG, Tanhehco EJ, Silverman N, Bernabei A, Sabbah HN.

Anti-inflamação: *J Immunol* 2003 Mar 15;170(6):3386-91, A broad-spectrum caspase inhibitor attenuates ale* airway inflammation in murine asthma model. Iwata A, Nshio K, Winn RK, Chi EY, Henderson WR Jr, Harlan JM.

Cirrose: i) *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Mar;3C8(3):1191-6, The caspase inhibitor Idn-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. Canbay A., Fledstein A., Baskin-Bey E., Bronk FS. Gores GJ.; ii) *Hepatology.* 2004 Feb;39(2):273-8, Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. Canbay A, Friedman S, Gores GJ.; iii) *Hepatology.* 2003 Nov;38(5):1188-98, Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, Gores GJ.

(7) Wu J. *et al, Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 1999, 17, 320.

(8) Hoglen N. C. *et al, J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001, 297, 811.

(9) Jaeschke H. *et al, Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000, 169,77.

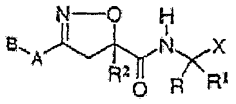
(10) Hoglen N.C. *et al, J. Pharmacol Exp. Ther.*, 2004, 309(2):634. Characterization of IDN-6556 (3-[2-(2-tert-butyl-phenylaminooxalyl)-amino]-propionylamino]-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-phenoxy)-pentanoic acid): a liver-targeted caspase inhibitor;

PI0413848

(11) Canbay A *et al*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2004, 3C8(3), 1191. The caspase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Recentemente projetou-se e sintetizou-se alguns compostos que podem ser usados como um inibidor efetivo contra caspases e possuem uma estrutura distintiva e seletividade alta para enzimas semelhantes, e determinaram sua capacidade de ligação e atividade inibitória para caspases. Como um resultado, verificou-se que um composto de seguinte fórmula (1) atende a tais requerimentos, e completaram a invenção.



(1)

na qual:

A, B, R, R^1, R^2, e X são como definidos abaixo.

Portanto, a presente invenção proporciona o novo derivado de isoxazolina de fórmula (1), seu sal, ou seu estereoisômero possuindo atividade inibitória contra caspases.

Outro objetivo da presente invenção é proporcionar um processo para preparar o composto de fórmula (1), seu sal, ou seu estereoisômero.

Também outro objetivo da presente invenção é proporcionar uma composição, um uso, ou um método para inibir caspases, especificamente uma composição terapêutica, um uso, ou um método para prevenir inflamação e apoptose, compreendendo o composto de fórmula (1), seu sal, ou seu estereoisômero como um ingrediente ativo juntamente com o veículo farmaceuticamente aceitável.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 mostra a atividade inibitória de Composto (Iii) contra

fibrose hepática devido à estagnação biliar: "(a)" na Figura 1 representa o caso de operação Simulada, "b)" representa o caso de operação BDL no qual apenas o veículo foi administrado após a ligação de duto biliar, "(c)" representa o caso no qual o Composto (Iii) foi administrado oralmente em uma dosagem de 3 mg/kg duas vezes ao dia por 1 semana após 1 semana da ligação de duto biliar, e "d)" representa o caso no qual o Composto (Iii) foi oralmente administrado em uma dosagem de 10 mg/kg duas vezes ao dia por 1 semana após 1 semana da ligação de duto biliar.

Figura 2 mostra a atividade inibitória de Composto (Iii) contra a apoptose celular hepática devido à estagnação biliar: "(a)" na Figura 2 representa o caso de operação Simulada, "b)" representa o caso de operação BDL no qual apenas o veículo foi administrado após a ligação de duto biliar, "(c)" representa o caso no qual o Composto (Iii) foi administrado oralmente em uma dosagem de 3 mg/kg duas vezes ao dia por 1 semana após 1 semana da ligação de duto biliar, e "d)" representa o caso no qual o Composto (Iii) foi oralmente administrado em uma dosagem de 10 mg/kg duas vezes ao dia por 1 semana após 1 semana da ligação de duto biliar, e "e)" é um gráfico mostrando o número de células hepáticas submetidas à apoptose em cada grupo de tratamento.

MELHOR MODO DE REALIZAR A INVENÇÃO

Antes da ilustração da presente invenção em detalhe, os seguintes termos importantes são primeiro definidos:

a) Cadeia de Alquila Simples (SAC, abaixo) significa um hidrocarboneto possuindo 1 a 8 átomos de carbono em sua forma isomérica linear ou ramificada.

b) Cadeia de Ciclo-Alquila Simples (SCAC, abaixo) significa uma radical cíclico possuindo 3 a 10 átomos de carbono.

c) Grupo Arila (Ar, abaixo) inclui grupos tanto aromáticos quanto heteroaromáticos. O grupo aromático significa um ciclo insaturado

único ou fusionado de 5 a 15 membros. Um ou mais hidrogênios podem estar substituídos por um grupo(s) selecionado(s) dos seguintes: grupo acila, amino, carboalcoxila, carboxila, carbóxi-amino, ciano, halo, hidroxila, nitro, tiol, alquila, ciclo-alquila, alcoxila, ariloxila, sulfoxila, e guanido. O grupo heteroaromático significa o grupo aromático contendo 1 a 5 heteroátomos selecionados de um grupo consistindo de oxigênio, enxofre, e nitrogênio. Igualmente, um ou mais hidrogênios podem estar substituídos por um grupo(s) selecionado(s) dos seguintes: grupo acila, amino, carboalcoxila, carboxila, carbóxi-amino, ciano, halo, hidroxila, nitro, tiol, alquila, ciclo-alquila, alcoxila, ariloxila, sulfoxila, e guanido. Ou, por exemplo, no caso de piridila, um grupo alquila pode ser adicionado no átomo de nitrogênio para converter o grupo piridila em um grupo piridínio possuindo carga-(+) no átomo de nitrogênio.

O grupo arila inclui fenila, bifenila, 1-naftila, 2-naftila, piridinila, N-alquil-piridínio, pirimidinila, quinolinila, benzotienila, indolila, pirazinila, isoindolila, isoquinolila, quinazolinila, quinoxalinila, ftalazinila, imidazolinila, isoxazolila, pirazolila, oxazolila, tiazolila, indolizinila, indazolila, benzotiazolila, benzimidazolila, benzofuranila, tienila, pirrolila, oxadiazolila, tiadiazolila, triazolila, tetrazolila, oxazolopiridinila, imidazopiridinila, isotiazolila, cinolinila, carbazolila, isochromanila, cromanila, tetra-hidro-isoquinolinila, isoindolinila, isobenzotetra-hidro-furanila, isobenzotetra-hidro-tienila, isobenzotienila, benzoxazolila, piridopiridinila, benzotetra-hidro-furanila, benzotetra-hidro-tienila, purinila, benzodioxolila, triazinila, fenoxazinila, fenotiazinila, pteridinila, benzotiazolila, imidazopiridinila, imidazotiazolila, di-hidro-benzisoxazinila, benzisoxazinila, benzoxazinila, di-hidro-benziso-tio-piranila, benzopiranila, benzo-tio-piranila, cumarinila, isocumarinila, cromonila, cromanonila, piridinil-N-óxido, tetra-hidro-quinolinil-N-óxido, di-hidro-quinolinila, di-hidro-quinolinonila, di-hidro-isoquinolinonila, di-hidro-cumarinila, di-hidro-

isocumarinila, isoindolinonila, benzodioxanila, benzoxazolinonila, N-alquil-piridínio, pirrolil-N-óxido, pirimidinil-N-óxido, pirazinil-N-óxido, quinolinil-N-óxido, N-óxido, isoquinolil-N-óxido, quinazolinil-N-óxido, quinoxalinil-N-óxido, ftalazinil-N-óxido, imidazolinil-N-óxido, isoxazolil-N-óxido, oxazolil-N-óxido, tiazolil-N-óxido, indolizinil-N-óxido, indazolil-N-óxido, benzotiazolil-N-óxido, benzimidazolil-N-óxido, pirrolil-N-óxido, oxadiazolil-N-óxido, tiadiazolil-N-óxido, triazolil-N-óxido, tetrazolil-N-óxido, etc.

d) Cadeia Alquila Simples substituída com Arila (SAC-Ar, abaixo) significa uma cadeia alquila linear ou ramificada que possui 1 a 8 átomos de carbono e está substituída com o grupo arila mencionado acima.

e) Aminoácido natural inclui os seguintes: Glicina, Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, Serina, Treonina, Cisteína, Metionina, Prolina, Ácido Aspártico, Asparagina, Ácido Glutâmico, Glutamina, Lisina, Arginina, Histidina, Fenil-alanina, Tirosina, e Triptofano.

f) O grupo protetor de éster simples é um hidrocarboneto possuindo 1 a 8 átomos de carbono na forma isomérica quer linear quer ramificada.

Em adição, o presente relatório descritivo inclui as seguintes abreviações:

N-cloro-succinimida: NCS

N-metil-morfolina: NMM

Hexaflurofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio: HATU

N,N-dimetil-formamida: DMF

1-(3-Dimetil-amino-propil)-3-etil-carbodiimida: EDC

1-Hhidróxi-benzotriazol hidratado: HOBt

Ácido trifluoroacético: TFA

t-Butóxi-carbonila: Boc

Benzil-óxi-carbonila: Cbz

Metila: Me

Etila: Et

Equivalente: Eq

Os substituintes incluídos na fórmula (I) acima são especificamente definidos como segue.

I) R representa H, cadeia alquila simples (-SAC), cadeia ciclo-alquila simples (-SCAC), grupo arila (-Ar), ou cadeia alquila simples substituída com arila (-SAC-Ar),

II) R^1 representa -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar, ou um resíduo de cadeia lateral de todos os aminoácidos naturais; e o composto de fórmula (1) poderá existir na forma diastereomérica específica, ou suas misturas quando o carbono no qual R^1 estiver ligado se torna um estereocentro devido ao grupo R^1; ou o composto de fórmula (1) poderá possuir um grupo protetor em uma forma de éster ($-CO_2R^3$ no qual R^3 é -SAC) ou em uma forma de sulfonamida ($-CONHSO_2R^4$ no qual R^4 é -SAC), ou poderá existir na forma de sal farmaceuticamente aceitável, quando R^1 for um resíduo de cadeia lateral de um aminoácido contendo grupo carboxila; ou o composto de fórmula (1) também poderá existir na forma de sal farmaceuticamente aceitável quando R^1 for um resíduo de cadeia lateral de um aminoácido contendo um grupo base.

III) R^2 representa -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar, ou um resíduo de cadeia lateral de aminoácidos naturais; e o composto de fórmula (1) poderá existir na forma diastereomérica específica, ou suas misturas quando o carbono no qual R^2 estiver ligado se torna um estereocentro devido ao grupo R^2; ou o composto de fórmula (1) poderá possuir um grupo protetor em uma forma de éster ($-CO_2R^5$ no qual R^5 é -SAC) ou em uma forma de sulfonamida ($-CONHSO_2R^5$ no qual R^5 é -SAC), ou poderá existir na forma de sal farmaceuticamente aceitável, quando R^2 for um resíduo de cadeia lateral de um aminoácido contendo grupo carboxila; ou o composto de fórmula (1)

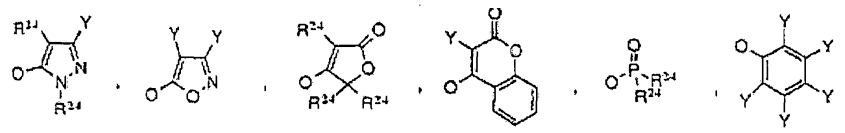
também poderá existir na forma de sal farmaceuticamente aceitável quando R^2 for um resíduo de cadeia lateral de um aminoácido contendo um grupo base; ou R^2 representa adicionalmente H; $-(CH_2)_nOR^7$ no qual R^7 é -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar, e n = 1 ou 2; ou $-(CH_2)_nOC(=O)R^8$ no qual R^8 é -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar, e n = 1 ou 2.

IV) A representa $-(CH_2)_n-$(n = 0-4), $-O-(CH_2)_n-$(n = 0-4), ou $-NR^9-(CH_2)_n-$(n = 0-4) nos quais R^9 é -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar,

V) B representa H, -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar, ou

VI) R e R^1 podem formar um ciclo juntamente com o átomo de carbono no qual estão ligados, onde-R-R^1-é $-(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_n-O-(CH_2)_m-$, ou $-(CH_2)_n-NR^{10}-(CH_2)_m-$ nos quais n+m < 9 e R^{10} é -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar, -C(=O)-SAC, -C(=O)-SCAC, -C(=O)-Ar, -C(=O)-SAC-Ar,

VII) X representa $-C(=O)CH_2OR^{11}$ no qual R^{11} é -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar; $-C(=O)CH_2OC(=O)R^{12}$ no qual R^{12} é -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar; $-CH=CH-CO_2R^{13}$ no qual R^{13} é -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar; $-CH=CH-SO_2R^{14}$ no qual R^{14} é -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar; $-C(=O)CH=CH_2$; ou $-COCH_2-W$ no qual W é $-N_2$, -F, -Cl, -Br, -I, $-NR^{15}R^{16}$ (R^{15} e R^{16} são, cada um, -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar, ou juntos podem formar grupo cíclico de 3 a 6 membros saturado ou insaturado), $-SR^{17}$ (R^{17} é -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar), ou é de seguinte fórmula:



nas quais:

Y é H, -OH, $-OR^{18}$ (R^{18} =-SAC ou -SCAC), $-C(=O)R^{19}$ (R^{19} =-H, -SAC, ou -SCAC), -F, -Cl, -Br, -I, -CN, $-N_3$, $-CO_2H$, CF_3, $-CO_2R^{20}$ (R^{20} =-SAC ou -SCAC), $-C(=O)NHR^{21}$ (R^{21} =-SAC ou -SCAC), ou $-C(=O)NR^{22}R^{23}$ (R^{22} e R^{23} são, cada um, -SAC ou -SCAC, -Ar, ou -SCAC-Ar),

R^{24} é H, -SCAC, -SAC-Ar, ou -Ar.

Os compostos preferidos dentre o composto de fórmula (1)

acima são os seguintes nos quais:

R representa H;

R^1 representa $-CH_2COOH$, $-CH_2COOR^3$ (R^3 = SAC), ou $-CH_2CONHSO_2R^4$ (R^4 = SAC);

R^2 representa H, -SAC, -Ar, ou $-(CH_2)_nOR^7$ (R^7 = -SAC, -SCAC, -Ar, ou -SCAC-Ar, e n = 1 ou 2); ou

X representa $-C(=O)CH_2OAr$, $-C(=O)CH_2OC(=O)Ar$, ou $-OCH_2-W$ no qual W é $-N_2$, -F, -Cl, -Br, -I, $-NR^{15}R^{16}$ (R^{15} e R^{16} são, cada um, -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar, ou juntos podem formar grupo cíclico de 3 a 6 membros saturado ou insaturado), ou $-SR^{17}$ (R^{17} é -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar).

Compostos mais preferidos dentre o composto de fórmula (1) acima são os seguintes nos quais:

(I) R representa H,

(II) R^1 representa $-CH_2COOH$, $-CH_2COOR^3$ (R^3 = SAC), ou $-CH_2CONHSO_2R^4$ (R^4 = SAC);

(III) R^2 representa H, -SAC, -Ar, ou $-(CH_2)_nOR^7$ (R^7 = -SAC, -SCAC, -Ar, ou -SCAC-Ar, e n = 1 ou 2); ou

IV) A representa $-(CH_2)_n-$(n = 0-4) ou $-O-(CH_2)_n-$(n = 0-4),

V) B representa H, -SAC, -SCAC, -Ar, ou -SAC-Ar,

VI) X representa $-COCH_2N_2$, $-COCH_2F$, $-COCH_2Cl$, $-COCH_2Br$, $-COCH_2I$, $-COCH_2OAr$, $-COCH_2OCOAr$ ou $-COCH_2SR^{17}$ (R^{17} é -SAC, -SCAC, -Ar ou -SAC-Ar).

Compostos particularmente preferidos são aqueles selecionados do seguinte grupo:

(1) ácido (3S)-5-[(2,6-dicloro-benzoil)-óxi]-3-{[[5-metil-3-fenil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-4-oxo-pentanóico (Iaa);

(2) ácido (3S)-3-{[(5-metil-3-fenil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-4-oxo-5-fenóxi-pentanóico (Ibb);

(3) ácido (3S)-3-{[(5-etil-3-fenil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Icc);

(4) ácido (3S)-3-({[5-etil-3-(1-naftil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Idd);

(5) ácido (3S)-3-({[5-etil-3-(2-naftil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Iee);

(6) ácido (3S)-3-({[5-etil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-arnino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Iff)

(7) ácido 3-({[5-etil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Igg);

(8) 3-({[5-etil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanoato de etila (Ihh);

(9) ácido 5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iii);

(10) ácido 3-({[5-etil-3-(4-quinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Ijj),

(11) ácido 3-({[3-(benzotiofen-2-il)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Ikk);

(12) ácido (3S)-3-({[3-(1,3-dimetil-1H-indol-2-il)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Ill);

(13) ácido 3-({[3-(1,3-dimetil-1H-indol-2-il)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil] carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Imm);

(14) ácido (3S)-3-({[5-etil-3-(1-naftil-metil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Inn);

(15) ácido (3S)-5-[(2,6-dicloro-benzoil)-óxi]-3-[({5-etil-3-[2-(1-naftil)-etil]-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-4-oxo-pentanóico (Ioo);

(16) ácido (3S)-3[({5-etil-3-[(1-naftil-óxi)-metil]-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino}-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Ipp);

(17) ácido (3S)-3-{[(3-{[(4-cloro-1-naftil-óxi]-metil}-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Iqq);

(18) ácido (3S,4E)-6-etóxi-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-6-oxo-4-hexenóico (Irr);

(19) ácido (3S,4E)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-(metil-sulfonil)-4-pentenóico (Iss);

(20) ácido 5-fluoro-3-({[(5S)-3-(1-isoquinolinil)-5-propil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Itt);

(21) ácido 3-({[(5S)-5-etil-3-(1-naftil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iuu);

(22) ácido 3-({[(5S)-5-etil-3-(2-quinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Ivv);

(23) ácido 3-({[(5R)-5-etil-3-(3-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iww);

(24) ácido 3-({[5-etil-3-(8-quinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Ixx);

(25) ácido 3-({[5-etil-3-(3-quinolinil.)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iyy);

(26) ácido 5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(2-quinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Izz);

(27) ácido 3-({[5-etil-3-(2-isopropil-fenil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa1);

(28) ácido 3-[({3-[3-(terc-butil)-fenil]-5-etil]-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa2);

(29) ácido 3-[({3-[4-(terc-butil)-fenil]-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil]-amino]-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa3);

(30) ácido 5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(2-isopropil-fenil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iaa4);

(31) ácido 3-[({(5R)-3-[3-(terc-butil)-fenil]-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa5);

(32) ácido 3-{[[(3-[1,1'-bifenil]-3-il-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa6);

(33) ácido 3-({[5-etil-3-(2-piridinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa7);

(34) ácido 3-[({3-[4-(terc-butil)-2-piridinil]-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa8);

(35) ácido 3-[({(5R)-3-[4-(terc-butil)-2-piridinil]-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa9);

(36) ácido 3-({[5-etil-3-(4-isobutil-2-piridinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa10);

(37) ácido 3-({[3-(4-acetil-2-piridinil)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa11);

(38) ácido 3-({[3-(4-ciclo-propil-2-piridinil)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa12);

(39) ácido 3-({[3-(4-ciclo-pentil-2-piridinil)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa13);

(40) ácido 3-({[(5R)-3-(4-ciclo-pentil-2-piridinil)-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa14);

(41) ácido 3-({[3-(4-ciclo-hexil-2-piridinil)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa15);

(42) ácido 3-({[5-etil-3-(5,6,7,8-tetra-hidro-1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa16);

(43) ácido [5-fluoro-3-({[5-isopropil.3-(4-fenil-2-piridinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iaa17);

(44) ácido (3S)-5-[(difenil-fosforil)-óxi]-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iaa18);

(45) ácido (3S)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-([1-fenil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-il]-óxi}-pentanóico (Iaa19);

(46) ácido (3S)-5-[(4-benzil-5-oxo-2,5-di-hidro-3-furanil)-óxi-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}amino)-4-oxo-pentanóico (Iaa20);

(47) ácido (3S)-5-(isobutiril-óxi)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iaa21);

(48) ácido (3S)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-hexenóico (Iaa22);

(49) ácido (3S)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2-piridinil-óxi)-pentanóico (Iaa23);

(50) ácido (3S)-3-({[5-etil-3-(2-isopropil-fenil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-arnino)-4-oxo-5-(2-piridinil-óxi)-pentanóico (Iaa24);

(51) trifluorometano-sulfonato de 2-{[(3S)-4-carbóxi-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-2-oxo-butil]-óxi}-1-metil-piridínio (Iaa25);

PI0413848

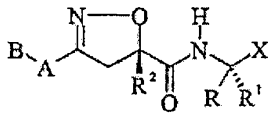
(52) trifluorometano-sulfonato de 2-{[(3S)-4-carbóxi-3-({[5-etil-3-(2-isopropil-fenil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-2-oxo-butil]-óxi}-1-metil-piridínio (Iaa26);

(53) ácido 3-({[3-(5-cloro-1-metil-1H-indol-2-il)-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa27);

(54) ácido 3-({[3-(1,5-dimetil-1H-indol-2-il)-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa28); e

(55) ácido (3S)-5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iii-1).

O composto de fórmula (I) de acordo com a presente invenção possui dois (2) átomos de carbono assimétricos, e portanto pode existir em sua forma estereoisomérica incluindo diastereômero. Compostos particularmente preferidos dentre os estereoisômeros são aqueles possuindo a fórmula (Ia):



(Ia)

e portanto outro objetivo da presente invenção é proporcionar o composto de fórmula (Ia) na forma estereoisomérica.

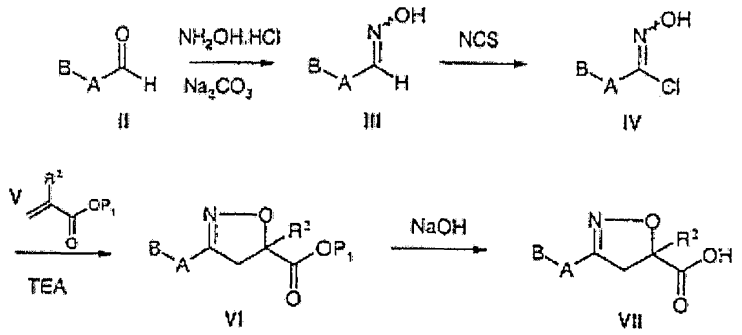
Dentre o composto de fórmula (Ia), por exemplo, o composto ácido (3S)-5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil)-amino)-4-oxo-pentanóico (Iii-1) pode ser obtido por um processo compreendendo as etapas de dissolver uma mistura de (3S) e (3R) em metil-t-butil-éter, adicionar uma quantidade pequena de ácido (3S)-5-fluoro-3-({[(5R)-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil)-amino)-4-oxo-pentanóico cristalino como um material de semente para dar um cristal, e recristalizar este cristal do sistema de

solventes de acetato de etila/n-hexano.

Os compostos mais preferidos dentre os compostos de fórmulas (1) e (1a) são ácido 5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iii); e ácido (3S)-5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iii-1).

Os processos para a preparação do novo derivado de isoxazolina de fórmula (1) mostrando uma atividade inibitória contra caspases são mostrados nos seguintes Esquemas de Reação 1 a 5. Contudo, aqueles ilustrados nos seguintes Esquemas de Reação representam apenas os processos típicos utilizados na presente invenção. A ordem de manipulaçaõ pode ser mudada sem limitação, e portanto os processos não estão restringidos àqueles explicados abaixo.

Esquema de Reação 1



no qual

A, B, e R^2 são definidos como descrito acima, e

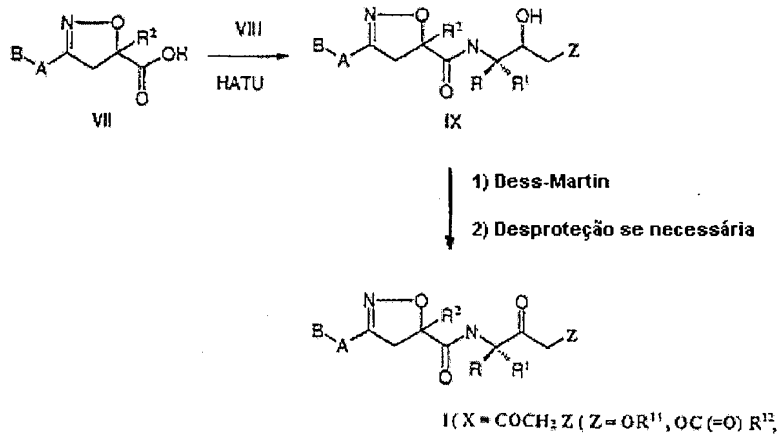
P_1 representa cadeia alquila simples.

No Esquema de Reação 1 acima, um derivado de aldeído (II) é reagido com cloridrato de hidroxil-amina e carbonato de sódio em uma mistura de solventes de álcool-água para dar um derivado de oxima (III) (uma mistura de *sin* e *anti* oximas). O derivado de oxima (III) resultante é tratado por NCS (N-cloro-succinimida) em solução de dimetil-formamida para dar um derivado de cloreto de hidroxamoíla (IV). O derivado de cloreto de

PT04138648

hidroxamoíla (IV) assim obtido é reagido com um derivado de acrilato (V) para dar um derivado de isoxazolina (VI), que é então hidrolisado, se necessário, para dar um derivado de isoxazolina desprotegido (VII). Se apropriado, o derivado de oxima (III), o derivado de acrilato (V), e NaOCl podem reagir juntos em um vaso de reação (*in situ*) para dar diretamente o derivado de isoxazolina (VI) (veja Preparações 16 e 17).

Esquema de Reação 2



na qual A, B, R, R^1, R^2, R^{11}, R^{12}, e W são definidos como descrito acima.

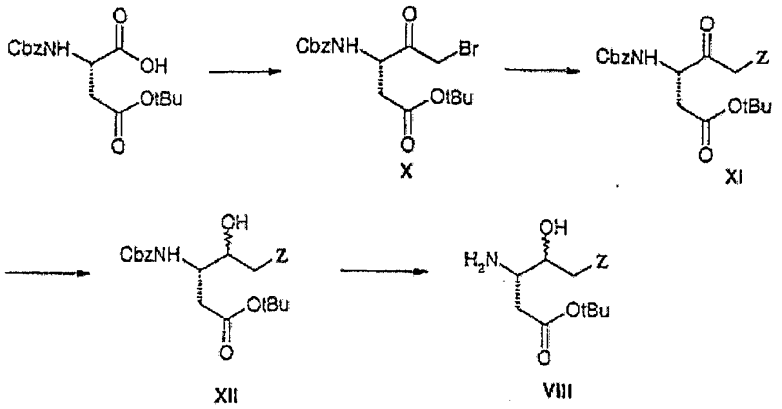
No Esquema de Reação 2 acima, um derivado de ácido carboxílico (VII) é copulado com um derivado de ácido aspártico (VIII) (veja o Esquema de Reação 3 seguinte) para dar um composto (IX), que é então submetido à reação de oxidação de periodinano de Dess-Martin, e à reação de desproteção, se necessária, para dar o composto de fórmula (1) desejado.

O grupo funcional Z no composto (I) do Esquema de Reação 2 pode ser formado por meio de várias etapas como exemplificadas nas seguintes Preparações 5 e 7 após o composto de ácido carboxílico (VII) no lado esquerdo se combinado com um metil-éster de ácido aspártico (β-t-Bu). De outro modo, como mostrado no Esquema de Reação 3 seguinte, o composto (VIII) já possuindo o Z desejado é sintetizado primeiro e copulado com o composto VIII (Ref.: WO 00/23421). Ainda mais, quando W for F, o

PI0413848

composto racêmico poderá ser preparado de acordo com um método conhecido em *Tetrahedron Letters*, 1994, 35(52), 9693-9696.

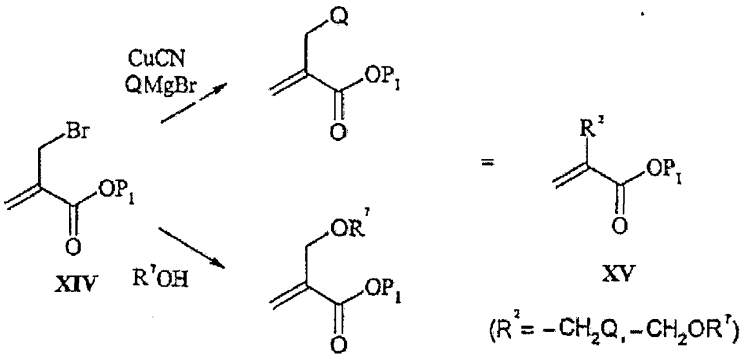
Esquema de Reação 3



no qual Z é definido como descrito acima.

O derivado de acrilato (V) usado como um reagente no Esquema de Reação 1 pode ser preparado via duas (2) rotas. Isto é, um composto (XV) pode ser facilmente preparado a partir de um composto (XVI) conhecido (*Synthesis*, 1982, p. 924) como mostrado no Esquema de Reação 4 seguinte, ou 2-i-propil-acrilato de metila (etila), o composto (V), pode ser preparado a partir de malonato de dimetila (dietila) (*J. Chemical Society Perkin Trans.* 1 1997, 1559-1570).

Esquema de Reação 4



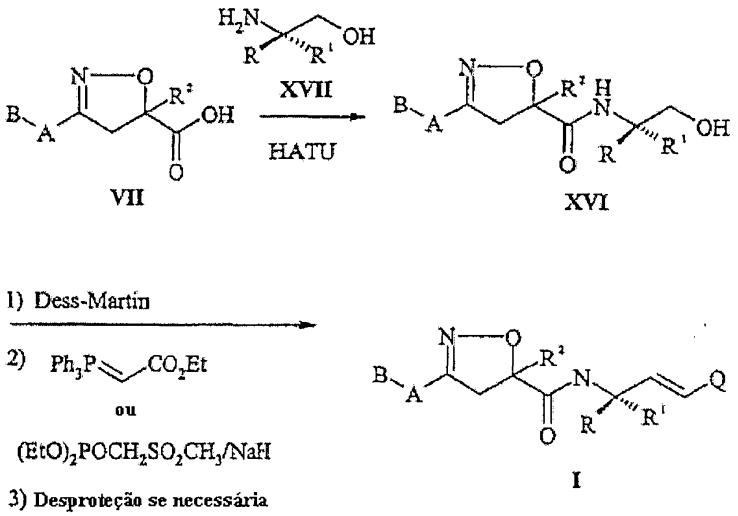
no qual P_1 e R^2 são definidos como descrito acima.

O seguinte Esquema de Reação 5 mostra um processo de

PT04384

síntese para preparar um composto no qual éster α,β-insaturado ou sulfona α,β-insaturada é introduzido(a) no sítio P_1. De acordo com isto, o derivado de ácido carboxílico (VII) como preparado no Esquema de Reação 1 é reagido com um derivado de amino-álcool (XVII) para dar um composto (XVI), que é então submetido à oxidação de Dess-Martin e às reações de Wittig para dar o composto (I).

Esquema de Reação 5



no qual

R, A, B, R^1, e R^2 são definidos como descrito acima, e

Q representa $-CO_2R^{13}$ ou SO_2R^{14}, no qual R^{13} e R^{14} são definidos como descrito acima.

O composto de fórmula (1) de acordo com a presente invenção possui um amplo espectro de atividade inibitória contra caspases como demonstrado pelos resultados dos Exemplos seguintes, e portanto possui um efeito para prevenir inflamação e apoptose. Assim, a presente invenção proporciona uma composição para inibir caspases, especificamente uma composição terapêutica para prevenir inflamação e apoptose, compreendendo o composto de fórmula (1 como um ingrediente ativo juntamente com o veículo farmaceuticamente aceitável. Especificamente, a composição da

presente invenção possui um efeito terapêutico para demência, derrame cerebral, enfraquecimento cerebral devido à AIDS, diabetes, úlcera gástrica, lesão cerebral por hepatite, doenças hepáticas induzidas por hepatite, hepatite aguda, insuficiência hepática fulminante, cirrose hepática, sépsis, rejeição de transplante de órgão, artrite reumatóide, ou apoptose celular cardíaca devido às doenças cardíacas isquêmicas, particularmente especificamente para hepatite aguda, cirrose hepática, ou artrite reumatóide.

O inibidor de caspase, particularmente o composto de fórmula (1), pode ser formulado em várias formas farmacêuticas para propósito de administração. Para preparar a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção, uma quantidade efetiva de inibidor de caspase, particularmente de composto de fórmula (1) ou de seu sal, é misturada com um veículo farmaceuticamente aceitável que pode tomar uma ampla variedade de formas dependendo da formulação a ser preparada.

O composto inibidor de caspase pode ser formulado como uma injeção parenteral, ou preparação percutânea ou oral dependendo de seu propósito de aplicação. É especialmente vantajoso formular a composição em uma forma de dosagem unitária devido à facilidade de administração e à uniformidade de dosagem.

Para a preparação oral, qualquer veículo farmacêutico normal pode ser usado. Por exemplo, água, glicóis, óleos, alcoóis e semelhantes podem ser utilizados para tais preparações líquidas orais como suspensões, xaropes, elixires e soluções; ou amidos, açúcares, caulim, lubrificantes, aglutinantes, agentes desintegrantes e semelhantes podem ser usados para tais preparações sólidas como pós, pílulas, cápsulas e tabletes. Devido à sua facilidade de administração, os tabletes e as cápsulas são as formas de dosagem unitária mais vantajosas. Também é desejável que os tabletes e as pílulas sejam formulados em preparação entericamente revestida.

Para preparação parenteral, água estéril é normalmente

empregada como o veículo, embora outros ingredientes tais como auxiliares de solubilidade possam ser usados. Injeções, por exemplo, suspensão oleosa ou aquosa esterilizada para injeção, podem ser preparadas de acordo com o procedimento conhecido usando agente dispersante, agente umectante, ou agente de suspensão adequado. Solventes que podem ser utilizados para preparar injeções incluem água, fluido de Ringer, e solução de NaCl isotônica, e também óleo fixo esterilizado pode ser convenientemente usado como o solvente ou meio de suspensão. Qualquer óleo fixo não-estimulante incluindo mono-, diglicerídeo pode ser empregado para este propósito. Ácido graxo tal como ácido oleico também pode ser usado para injeções.

Para administração percutânea, o veículo pode incluir um agente intensificador de penetração e/ou um agente umectante adequado, opcionalmente combinado com aditivos apropriados não possuindo irritação significativa para a pele. Aditivos citados podem facilitar a administração através da pele e/ou podem ajudar na preparação de uma composição desejada. Estas preparações percutâneas são administradas via várias maneiras, por exemplo, como um remendo transdermal, uma mancha sobreposta, ou uma pomada.

Quando o inibidor de caspase, especificamente o composto de fórmula (1), for usado para propósito clínico, ele será preferivelmente administrado ao paciente individual em uma quantidade variando de 0,1 a 100 mg por kg de peso corpóreo por dia. A dosagem diária total pode ser administrada uma vez ou várias vezes. Contudo, dosagem de administração específica para um paciente individual pode ser variada com o composto específico utilizado, peso corpora, sexo, condições de higiene, ou dieta do paciente individual, tempo ou método de administração, velocidade de excreção, razão de misturação de agente, severidade da doença a ser tratada etc.

A presente invenção será agora explicada mais

especificamente pelos seguintes exemplos. Contudo, deve ser entendido que estes exemplos são intencionados para ilustrarem a presente invenção mas não em qualquer maneira para limitarem o escopo da presente invenção.

Preparação 1

Benzaldeído-oxima

Benzaldeído (5,31 g, 50,0 mmoles) foi dissolvido em etanol (60 mL)-água (30 mL), e cloridrato de hidroxil-amina 5,21 g, 1,5 Eq) e carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3, 3,97 g, 0,75 Eq) foram adicionados no mesmo a 0°C. Quando uma quantidade grande de sólido foi formada após cerca de um minuto, água-etanol (1:1, 60 mL) foi adicionado, e a mistura foi agitada por uma hora. Solução aquosa saturada de cloreto de sódio (100 mL) foi adicionada, e a mistura foi extraída duas vezes com acetato de etila (300 mL). O extrato foi lavado com solução aquosa de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$, 100 mL x 2), seco (Na_2SO_4 anidro), e concentrado sob pressão reduzida para dar o composto do título (6,06 g, rendimento de 99%) como um pó branco como uma mistura *cis* e *trans*.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8,90 (br, 1H), 8,1 (s, 1H), 7,5 (m, 2H), 7,3 (m, 3H).

Preparação 2

Cloreto de benzaldeído-hidroxamoíla

A oxima preparada na Preparação 1 (3,00 g, 24,8 mmoles) foi dissolvida em dimetil-formamida (100 mL), e N-cloro-suscinimida (3,47 g, 1,05 Eq) foi adicionada. A solução resultante foi agitada por uma hora um banho de água de cerca de 40°C, e o solvente volátil foi removido por destilação sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em acetato de etila-hexano (1:1, 150 mL), lavado com água (100 mL x 3), seco (Na_2SO_4 anidro), e concentrado sob pressão reduzida para dar o composto do título (3,86 g, rendimento de 99%). Este composto foi usado na reação seguinte sem qualquer purificação adicional.

PI0413848

Preparação 3

5-Metil-3-fenil-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxilato de metila (VIa)

O cloreto de hidroxamoíla na Preparação 2 (3,86 g, 24,8 mmoles) e metacrilato de metila (4,0 mL, 37,2 mmoles, 1,5 Eq) foram dissolvidos em dietil-éter seco (120 mL) sob atmosfera de nitrogênio, a mistura foi mantida a-78°C, e trietil-amina (6,9 mL, 2,0 Eq) foi adicionada. A mistura foi agitada durante a noite enquanto era aquecida lentamente para a temperatura ambiente. Água (100 mL) foi adicionado, e então a mistura foi extraída com acetato de etila (100 mL x 2), lavada com água (100 mL), seca (Na_2SO_4 anidro), e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (acetato de etila 15%-hexano) para dar o composto do título (5,34 g, rendimento de 98%), que foi então identificado por ^{1}H-NMR como sendo mistura 1:1 de diastereômeros.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6,7 (m, 2H), 6,5 (m, 3H), 3,0 (d, J = 16,7 Hz, 1H), 2,9 (s, 3H), 2,3 (d, J = 16,7 Hz, 1H), 0,8 (s, 3H).

Preparação 4

Ácido 5-metil-3-fenil-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxílico (VIIa)

O composto preparado na Preparação 3 (VIa, 5,34 g) foi dissolvido em tetra-hidro-furano destilado (120 mL), e solução aquosa de hidróxido de sódio 1 N (36,5 mL, 1,5 Eq) foi adicionada. Após cerca de quatro horas, a mistura foi neutralizada por solução aquosa de ácido clorídrico 1 N e destilada sob pressão reduzida para remover a maior parte de tetra-hidro-furano. O resíduo foi dissolvido em acetato de etila em excesso (> 700 mL), lavado com água, seco (Na_2SO_4 anidro), e concentrado sob pressão reduzida para dar o composto do título (4,77 g, rendimento de 95%) como um pó branco. Este composto foi usado na reação seguinte sem qualquer purificação adicional.

PI0413848

Preparação 5

2,5-Dicloro-benzoato de (3S)-3{[(benzil-óxi)-carbonil]-amino}-5-(t-butóxi)-2-hidróxi-5-oxo-pentila (XIIa)

Em ácido N-benzil-óxi-carbonil-β-t-butil-aspártico (5,03 g, 15,6 mmoles) e NMM (1,90 mL, 17,1 mmoles) foi adicionado tetra-hidro-furano seco (60 mL) sob atmosfera de nitrogênio, a mistura foi mantida a-15°C, e cloro-formiato de isobutila (2,12 mL, 16,3 mmoles) foi adicionado na mesma. A mistura foi agitada por cerca de 20 minutos. Na mistura reacional sendo mantida a 0°C foi adicionada solução etérea de diazometano (sintetizado a partir de 2,0 Eq de 1-metil-3-nitro-1-nitroso-quanidina, 60 mL) para preparar o derivado de diazocetona (~30 minutos). HBr 30%/AcOH (6,42 mL, 2,0 Eq) foi adicionado na mesma a 0°C. A mistura resultante foi agitada (30-60 minutos), extraída com acetato de etila, lavada duas vezes com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio e uma vez com solução aquosa de cloreto de sódio, seco (Na_2SO_4 anidro), e concentrada sob pressão reduzida para dar o derivado de bromo-metil-cetona (X, 6,4 g).

O derivado de bromo-metil-cetona (X, 4,36 g) assim obtido e ácido 2,6-dicloro-benzóico (2,28 g, 1,1 Eq) foram dissolvidos em dimetil-formamida (18 mL), KF (1,58 g, 2,5 Eq) foi adicionado, e a mistura foi agitada por duas horas para dar o derivado de 2,6-dicloeo-benzoil-óxi-metil-cetona (XIa). Este composto foi dissolvido em metanol (20 mL) e reagido com solução metanólica de $NaBH_4$ (412 mg) (40 mL) (-10°C ~temperatura ambiente, duas horas). A reação foi interrompida por ácido acético, e a solução reacional foi destilada sob pressão reduzida para remover metanol. O resíduo foi extraído com acetato de etila (50 mL x 2), lavado com água e solução aquosa de cloreto de sódio, seco (Na_2SO_4 anidro), concentrado sob pressão reduzida, e separado-purificado por cromatografia em coluna (acetato de etila-hexano, 1:5) para dar o composto do título (4,80 g, rendimento de 86%) em uma forma diastereomérica.

PI0413948

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,3-7,2 (m, 8H), 5,9 (m, 1H), 5,2 (m, 4H), 4,7 (m, 1H), 2,9 (m, 1H), 2,7 (m, 1H), 1,4 (s, 9H).

Preparação 6

2,6-Dicloro-benzoato de (3S)-3-amino-5-(t-butóxi)-2-hidróxi-5-oxo-pentila (VIIIa)

O grupo benzil-óxi-carbonila do composto preparado na Preparação 5 foi removido (Pd/C) sob hidrogênio de cilindro por 40 minutos para dar o composto do título (rendimento de 100%).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,2 (br, 2H), 7,6-7,5 (m, 3H), 6,1 (m, 1H), 4,4-3,9 (m, 3H), 3,0-2,6 (m, 2H), 1,4 (s, 9H).

Exemplo 1

2,6-Dicloro-benzoato de (3S)-5-(t-butóxi-(-3-{[(5-metil-3-fenil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil}-amino-2,5-dioxo-pentila (Ia)

Uma mistura do derivado de ácido carboxílico preparado na Preparação 4 (VIIa, 300 mg, 1,46 mmoles), o derivado de amino-álcool preparado na Preparação 6 (VIIIa, 667 mg, 1,1 Eq) foi adicionada em um solvente de DMF (5 mL), e a mistura resultante foi reagida por 5 horas. O solvente foi destilado sob pressão reduzida, e o resíduo foi extraído com acetato de etila (200 mL x 2), lavado com água, solução aquosa de bicarbonato de sódio, solução aquosa de cloreto de sódio, seco (Na_2SO_4 anidro), concentrado sob pressão reduzida, e purificado por cromatografia em coluna para dar o Composto (IXa) (810 mg, rendimento d 98%). Neste composto e o reagente de Dess-Martin (1,70 g, 3,0 Eq) foi adicionado dicloro-metano seco (25 mL), e a mistura foi agitada por uma hora na temperatura ambiente. A reação foi interrompida por isopropil-álcool (3 mL). O sólido foi removido por filtração sob pressão reduzida através de Celite, e o filtrado foi extraído com acetato de etila (20 mL x 2), lavado com água, solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio e solução aquosa de cloreto de sódio, seco (Na_2SO_4 anidro), concentrado sob pressão reduzida, e preliminarmente

purificado por cromatografia em coluna (acetato de etila 36%-hexano) para dar o composto do título diastereomérico (780 mg).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,8 (m, NH, 1H), 7,6 (m, 2H), 7,3 (m, 3H), 7,2 (m, 3H), 5,1-5,0 (m, 2H), 4,8 (m, 1H), 3,8 (m, 1H), 3,2 (m, 1H), 2,9-2,8 (m, 2H), 1,7 (s, 3H), 1,4 (s, 9H).

Exemplo 2

Ácido (3S)-5-[(2,6-dicloro-benzoil)-óxi]-3-{[(5-metil-3-fenil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-4-oxo-pentanóico (Iaa)

O composto preparado no Exemplo 1 (44 mg) foi dissolvido em dicloro-metano (2 mL), e ácido trifluoro-acético (1 mL) foi adicionado a 0°C. A mistura foi agitada por duas horas enquanto era lentamente aquecida para a temperatura ambiente, e então foi concentrada sob pressão reduzida para dar o composto do título (Iaa) em uma quantidade estequiométrica.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8,1 (m, 1H), 7,5 (m, 2H), 7,3 (m, 3H), 7,2 (m, 3H), 5,1-4,9 (m, 2H), 4,9-4,8 (m, 1H), 3,8 (m, 1H), 3,2 (m, 1H), 1,7 (m, 3H).

Preparação 7

(3S)-3-amino-4-hidróxi-5-fenóxi-pentanoato de t-butila (VIIIb)

Em ácido N-benzil-óxi-carbonil-β-t-butil-aspártico (10,0 g, 31,0 mmoles) e NMM (3,75 mL, 1,1 Eq) foi adicionado tetra-hidro-furano seco (120 mL) sob atmosfera de nitrogênio, a mistura foi mantida a-15°C. Cloro-formiato de isobutila (4,22 mL, 1,5 Eq) foi adicionado na mesma, e a mistura foi agitada por cerca de 20 minutos. Os reagentes foram mantidos a 0°C os quais foram então misturados com solução étera de diazometano (sintetizado a partir de 2,0 Eq de 1-metil-3-nitro-1-nitroso-quanidina, 60 mL) para preparar o derivado de diazocetona (~30 minutos). HBr 30%/AcOH (12,83 mL, 2,0 Eq) foi adicionado na mesma para preparar o derivado de

PI0413648

bromo-metil-cetona (30-60 minutos). O produto foi extraído com acetato de etila, lavado duas vezes com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio e solução aquosa de cloreto de sódio, seco (Na_2SO_4 anidro), e concentrado sob pressão reduzida para dar o derivado de bromo-metil-cetona (12,9 g) em uma quantidade estequiométrica.

O derivado de bromo-metil-cetona (X, 12,9 g, 31,0 mmoles) assim obtido e fenol (3,23 g, 1,2 Eq) foram dissolvidos em dimetil-formamida (30 mL), KF (4,53 g, 2,5 Eq) foi adicionado, e a mistura foi agitada por duas horas para dar o derivado de fenóxi-metil-cetona (XIb). Este composto foi dissolvido em metanol (40 mL)-THF (100 mL) e foi reagido com solução metanólica de $NaBH_4$ (2,35 g) (40 mL) (-10°C ~temperatura ambiente, duas horas). A reação foi interrompida por ácido acético, e a mistura reacional foi destilada sob pressão reduzida para remover metanol. O resíduo foi extraído com acetato de etila (50 mL x 2), lavado com água e solução aquosa de cloreto de sódio, seco (Na_2SO_4 anidro), concentrado sob pressão reduzida, e separado-purificado por cromatografia em coluna (acetato de etila-hexano, 1:7) para dar o composto do título (XIIb, 6,50 g, rendimento de 50%) em uma forma diastereomérica cujo grupo amino está protegido por benzil-óxi-carbonila.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,3-7,2 (m, 8H), 5,9 (m, 1H), 5,2 (m, 4H), 4,7 (m, 1H), 2,9 (m, 1H), 2,7 (m, 1H), 1,4 (s, 9H).

O grupo benzil-óxi-carbonila do composto obtido acima foi removido (Pd;C) sob hidrogênio de cilindro para dar o composto do título (4,16 g, rendimento de 95%).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,1 (br, 2H), 7,3 (m, 5H), 5,6 (m, 1H), 4,1-4,0 (m, 3H), 2,6 (m, 2H), 1,4 (s, 9H).

Exemplo 3

(3S)-3-{[(5-metil-3-fenil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-4-oxo-5-fenóxi-pentanoato de t-butila (Ib)

Uma mistura do derivado de ácido carboxílico preparado na

PI0413846

Preparação 4 (VIIa, 273 mg, 1,33 mmoles), o derivado de amino-álcool preparado na Preparação 7 (VIIIb, 412 mg, 1,1 Eq) e HATU (657 mg, 1,3 Eq) foi esfriada para 0°C, trietil-amina (0,74 mL, 4,0 Eq) foi adicionada em um solvente de DMF (5 mL), e a mistura resultante foi reagida por 5 horas. O solvente foi destilado sob pressão reduzida, e o resíduo foi extraído com acetato de etila (200 mL x 2), lavado com água, solução aquosa de bicarbonato de sódio, e solução aquosa de cloreto de sódio, seco (Na_2SO_4 anidro), concentrado sob pressão reduzida, e purificado por cromatografia em coluna (EA 30-40% /Hex) para dar o Composto (IXb) (545 mg, rendimento de 88%). Neste composto e reagente de Dess-Martin (1,43 g, 3,0 Eq) foi adicionado dicloro-metano seco (25 mL), e a mistura foi agitada por uma hora na temperatura ambiente. A reação foi interrompida por isopropil-álcool (2 mL). O sólido foi removido por filtração sob pressão reduzida através de Celite, e o filtrado foi extraído com acetato de etila (20 mL x 2), lavado com água, solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio e solução aquosa de cloreto de sódio, seco (Na_2SO_4 anidro), concentrado sob pressão reduzida, e preliminarmente purificado por cromatografia em coluna (acetato de etila 25%-hexano) para dar o composto do título diastereomérico (540 mg, rendimento de 99%).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,8 (NH, 1H), 7,5 (m, 2H), 7,3 (m, 3H), 7,3 (m, 1H), 7,1 (m, 1H), 6,8 (m, 2H), 6,7 (m, 1H), 4,9 (s, 1H), 4,7-4,6 (m, 2H), 3,7 (d, J = 17 Hz, 1H), 3,2 (d, J = 17 Hz, 1H), 2,9 (m, 1H), 2,8 (m, 1H), 1,7 (s, 3H), 1,4 (s, 9H).

Exemplo 4

Ácido (3S)-3-{[(5-metil-3-fenil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-4-oxo-5-fenóxi-pentanóico (Ibb)

O composto preparado na Preparação 3 (530 mg, 1,136 mmoles) foi dissolvido em dicloro-metano (6 mL), e ácido trifluoro-acético (3

PI0413848

mL) foi adicionado a 0°C. A mistura foi agitada por duas horas enquanto era lentamente aquecida para a temperatura ambiente, e foi concentrado sob pressão reduzida para dar o composto do título (Ibb) (465 mg) com um rendimento estequiométrico.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,5 (m, 2H), 7,3 (m, 3H), 7,1 (NH, 1H), 6,7 (m, 5H), 5,0-4,6 (m, 2H), 4,2 (m, 1H), 3,8 (m, 1H), 3,2 (m, 1H), 3,0-2,7 (m, 2H), 1,6 (s, 3H).

Preparação 8

2-Etil-acrilato de etila (XVb)

Em CuCn (26,9 g, seco anteriormente sob vácuo) foram adicionados sob atmosfera de nitrogênio cerca de 500 mL de tetra-hidro-furano seco. A mistura foi mantida a-78°C e 100 L de brometo de metil-magnésio (3,0 M em solução de dietil-éter) foi lentamente adicionado na mesma sob agitação mecânica. A mistura espessa foi agitada por cerca de 30 minutos a-78°C. 2-Bromo-metil-acrilato de etila (28,9 g, 150 mmoles, método de síntese: Vilieras, J. e Rambaud, M. *Synthesis*, 1982, 914) dissolvido em cerca de 30 mL de tetra-hidro-furano seco foi lentamente adicionado na mesma. A temperatura da mistura reacional foi lentamente elevada para a temperatura ambiente durante duas horas. A reação foi completada pela adição lenta de solução saturada de cloreto de amônio (~50 mL). A mistura reacional foi filtrada através de Celite para remover o precipitado, e então foi lavada com dietil-éter. A camada orgânica foi lavada com água e solução saturada de bicarbonato de sódio (300 mL x 2), seca (Na_2SO_4 anidro), e concentrada sob pressão reduzida para dar 26,7 g (rendimento estequiométrico) de um líquido transparente. Este líquido foi identificado por ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) e foi confirmado que é o composto do título possuindo uma pureza de cerca de 75% p/p.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 6,12 (1H, s), 5,50 (1H, s), 4,20 (2H, q, J = 7,3 Hz), 2,31 (2H, qt), 1,28 (3H, t, J = 7,3 Hz), 1,07 (3H, t, J = 7,8

Hz).

Preparação 9

5-Etil-3-fenil-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxilato de etila (VIIb)

O composto da Preparação 8 (XVa) foi reagido de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 3 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ 7,6 (m, 2H), 7,4-7,3 (m, 3H), 4,34,2 (m, 2H), 4,0 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 3,4 (d, J=17,2Hz, 1H), 2,1-2,0 (m, 2H), 1,3 (t, 3H), 1,0 (t, 3H).

Preparação 10

(3S)-3-amino-4-hidróxi-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanoato de t-butila (VIIIc)

2,3,5,6-Tetrafluoro-fenol foi reagido de acordo com o procedimento igual ao das Preparações 5 e 6 para dar o composto do título com um rendimento de 72%.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 8,2 (br, 2H), 7,6-7,5 (m, 1H), 5,9 (m, 1H), 4,3-4,1 (m, 3H), 3,6 (m, 1H), 2,7 (m, 1H), 1,4 (s, 9H)

Exemplo 5

(3S)-3-{[(5-etil-3-fenil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanoato t-butila (Ic)

Os compostos das Preparações 9 e 10 foram preparados de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4 e do Exemplo 1 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ 7,6 (dd, J = 3,6, 1,6Hz, 1H), 7,6 (m, 2H), 7,4-7,3 (m, 3H), 6,7 (m, 1H), 5,1-4,9 (m, 2H), 4,9-4,8 (m, 1H), 3,7 (dd, J = 17,6, 17,2 Hz, 1H), 3,3 (1H, d, J = 17,2Hz), 3,0-2,8 (m, 1H), 2,8-2,7 (m, 1H), 2,1 (m, 1H), 1,9 (m, 1H), 1,4-1,3 (dois s, 9H,), 1,0 (m, 3H)

PI0413848

Exemplo 6

Ácido (3S)-3-{[(5-etil-3-fenil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Icc)

O composto do Exemplo 5 foi reagido de acordo com o procedimento igual ao do Exemplo 2 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 7,6 (br, 1H), 7,6-7,5 (m, 2H), 7,4-7,3 (m, 3H), 6,8-6,7 (m, 1H), 4,9-4,8 (m, 1H), 4,5 (br, 2H), 3,7 (d, J = 16Hz, 1H), 3,3 (d, J = 16Hz, 1H), 3,3-3,0 (m, 1H), 2,8-2,7 (m, 1H), 2,1 (m, 1H), 2,0-1,9 (m, 1H), 1,0 (m, 3H).

MS $[M+H]^+$ 497.

Preparação 11

5-Etil-3-(1-naftil)-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxilato de etila (VIc)

1-Naftaldeído e 2-etil-acrilato de etila foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao das Preparações 1, 2, e 3 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ 8,9 (d, J = 8,8Hz, 1H), 7,9-7,8 (m, 2H), 7,6-7,4 (m, 4H), 4,3-4,2 (m, 2H), 4,0 (d, J = 17,2Hz, 1H), 3,4 (d, J = 17,2Hz, 1H), 2,1-2,0 (m, 2H), 1,3 (t, 3H), 1,0 (t, 3H).

Exemplo 7

(3S)-3-({[5-etil-3-(1-naftil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanoato de t-butila (Id)

Os compostos das Preparações 11 e 10 foram, reagidos de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4 e do Exemplo 1 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$)δ 8,9 (m, 1H), 7,9-7,8 (m, 3H), 7,6-7,4 (m, 4H), 6,5-6,9 (m, 1H), 5,1-4,9 (m, 2H), 4,9 (m, 1H), 3,9 (dd, 1H), 3,5 (d, J = 17,2Hz, 1H), 3,0-2,9 (m, 1H), 2,8 (m, 1H), 2,2 (m, 1H), 2,0 (m,

1H), 1,4-1,3 (dois s, 9H), 1,1 (m, 3H)

Exemplo 8

Ácido (3S)-3-({[5-etil-3-(1-naftil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Idd)

O composto do Exemplo 7 foi reagido de acordo com o procedimento igual ao do Exemplo 2 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ 8,8 (m, 1H), 7,9-7,7 (m, 3H), 7,6-7,4 (m, 4H), 6,7 (m, 1H), 4,9 (m, 1H), 4,5 (br, 2H), 3,9 (d, J = 17,2Hz, 1H), 3,5 (d, J = 17,2Hz, 1H), 3,1-2,9 (m, 1H), 2,8-2,7(m, 1H), 2,2 (m, 1H), 2,0 (m, 1H), 1,0 (m, 3H) MS $[M+MeOH+Na]^+$ 601

Preparação 12

5-Etil-3-(2-naftil)-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxilato de etila (VId)

2-Naftaldeído e 2-etil-acrilato de etila foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao das Preparações 1, 2, e 3 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(500MHz, $CDCl_3$) δ 8,7(d, J = 8,8Hz, 1H), 7,8-7,7 (m, 2H), 7,5-7,3 (m, 4H), 4,3-4,2 (m, 2H), 4,0 (d, J = 17,2Hz, 1H), 3,4 (d, J = 17,2Hz, 1H), 2,1-2,0 (m, 2H), 1,3 (t, 3H), 1,0 (t, 3H)

Exemplo 9

(3S)-3-({{5-etil-3-(2-naftil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanoato de t-butila (Ie)

Os compostos das Preparações 12 e 10 foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4 e do Exemplo 1 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ 7,8-7,7 (m, 6H), 7,5 (m, 2H), 6,7-6,5 (m, 1H), 5,1-4,9 (m, 2H), 4,9-4,8 (m, 2H), 3,8 (dd, J = 16Hz, 1H), 3,4 (d, J = 16Hz, 1H), 3,0 (m, 1H), 2,8 (m, 1H), 2,8-2,7 (m, 1H), 2,2-2,1 (m, 1H),

PI0413848

2,0 (m, 1H), 1,4-1,3 (dois s, 9H), 1,1-1,0 (m, 3H)

Exemplo 10

Ácido (3S)-3-({[5-etil-3-(2-naftil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Iee);

O composto do Exemplo 9 foi desprotegido de acordo com o procedimento igual ao do Exemplo 2, e os isômeros foram resolvidos por TLC preparativa para dar os dois compostos.

Diastereômero fracamente polar:

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 12,4 (br, 1H), 8,7 (br, 1H), 8,1 (s, 1H), 7,9-8,0 (m, 3H), 7,8-7,9 (m, 1H), 7,5-7,6 (m, 3H), 5,2 (br, 2H), 4,7 (br, 1H), 3,8 (d, J = 17,2Hz, 1H), 3,5 (d, J = 17,6Hz, 1H), 2,7 (m, 1H), 2,5 (m, 1H), 2,0 (m, 1H), 1,9 (m, 1H), 0,9-0,8 (m, 3H)

MS $[M+H]^+$ 547

Diastereômero elevadamente polar:

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 8,6 (br, 1H), 8,2 (s, 1H), 8,0-7,9 (m, 3H), 7,9 (m, 1H), 7,6 (m, 2H), 7,4 (m, 1H), 5,0 (br, 2H), 4,8 (m, 1H), 3,9 (d, J = 17,6Hz, 1H,), 3,6 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 2,9-2,7 (m, 2H), 2,1-2,0 (m, 1H), 2,0-1,9 (m, 1H), 0,9 (m, 3H)

Preparação 13

5-etil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxilato de etila (VIe)

1-Isoquinolina-aldeído e 2-etil-acrilato de etila foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao das Preparações 1, 2 e 3. O composto do título em uma forma isomérica quiral ativa foi separado por HPLC OD Quiral (Daicel Chemical Industries, 2,00cm x 25cm, OD00CJ-1C005, 3% i-PrOH em Hexano, 220 nm), que foi então usado na reação seguinte.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,25 (m, 1H), 8,55 (d, 1H), 7,85 (d, 1H), 7,74-7,65 (m, 3H), 4,29 (m, 2H), 4,13 (d, 1H), 3,71 (d, 1H), 2,11 (m, 2H), 1,33 (t, 3H), 1,06 (t, 3H)

Exemplo 11

(3S)-3-({[5-etil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanoato de t-butila (If)

Os compostos das Preparações 13 e 10 foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4 e do Exemplo 1 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,14 (m, 1H), 8,53 (m, 1H), 7,91-7,85 (m, 2H), 7,74-7,64 (m, 3H), 6,73-6,62 (m, 1H), 5,30-4,91 (m, 3H), 4,09 (dois d, 1H), 3,72 (dois d, 11-1), 3,04-2,76 (m, 2H), 2,24 (m, 1H), 2,04 (m, 1H), 1,45 & 1,35 (dois s, 91-1), 1,08 (dois t, 3H)

Exemplo 12

Ácido (3S)-3-({[5-etil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-arnino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Iff)

O composto do Exemplo 11 foi reagido de acordo com o procedimento igual ao do Exemplo 2 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 9,02(m, 1H), 8,76(m, 1H), 8,59(m, 1H), 8,08-7,73(m, 4H), 7,61-7,32(m, 1H), 5,19-5,10(m, 2H), 4,93-4,65(m, 1H), 3,91 (dois d, 1H), 3,68 (dois d, 1H), 2,91-2,52 (m, 2H), 2,10-1,94 (m, 2H), 0,94 (dois t, 3H)

Massa : M+H 548

Exemplo 13

3-({[5-Etil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanoato de t-butila (Ig)

O composto da Preparação 13 e 3-amino-5-fluoro-4-hidróxi-pentanoato de t-butila foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4 e do Exemplo 1 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,15 (m, 1H), 8,55 (d, 1H),

7,87-7,66 (m, 5H), 5,22-4,89 (m, 3H), 4,12 (dois d, 1H), 3,72 (dois d, 1H), 3,05-2,75 (m, 2H), 2,22 (m, 1H), 2,04 (m, 1H), 1,45 & 1,34 (dois s, 9H), 1,07 (dois t, 3H)

Exemplo 14

Ácido 3-({[5-etil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Igg)

O composto do Exemplo 13 foi reagido de acordo com o procedimento igual ao do Exemplo 2 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 9,03 (m, 1H), 8,67-8,59 (m, 2H), 8,03 (d, 1H), H), 7,97-7,78 (m, 3H), 5,26-5,07 (m, 2H), 4,75 (m, 1H), 3,94 (dois d, 1H), 3,67 (dois d, 1H), 2,88-2,58 (m, 2H), 2,07-1,94 (m, 2H), 0,96 (dois t, 3H)

Massa : M+H 402

Exemplo 15

3-({[5-etil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanoato de etila (Ihh)

O composto do Exemplo 14 foi reagido de acordo com o método conhecido em *Tetrahedron Letters*, 1994, 35(52), 9693-9696 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,15 (m, 1H), 8,55 (d, 1H), 7,89-7,67 (m, 5H),

5,23-4,94 (m, 3H), 4,18 (m, 2H), 4,11 (dois d, 1H), 3,72 (dois d, 1H), 3,08-2,82 (m, 2H), 2,22 (m, 1H), 2,05 (m, 1H), 1,29-1,04 (m, 6H)

Preparação 14

5-Isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxilato de metila e resolução (VIf)

1-Isoquinolina-aldeído e 2-isopropil-acrilato de metila foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao das Preparações 1, 2 e 3 para dar o composto do título. Do composto assim obtido, (5R)-isômero quiral

ativo (9,7min-11,7min) foi separado por HPLC preparativa usando coluna OD quiral (Daicel Chemical Industries, 2,00cm x 25cm, OD00CJ-1C005, 5% i-PrOH em Hexano, 14 mL /min, 220 nm) (o outro (5S)-isômero foi eluído durante o tempo de retenção de 15,3-20,1 min), o qual foi então usado na reação seguinte (veja a Preparação 23 para a resolução após hidrólise).

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 9,24 (m, 1H), 8,55 (d, 1H), 7,85 (d, 1H), 7,72 (t, 3H), 7,67 (m, 2H), 4,11 (d, 1H), 3,83 (s, 3H), 3,74 (d, 1H), 2,50 (septeto, 1H), 1,07(d, 3H), 1,02(d, 3H)

Exemplo 16

5-Fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanoato de t-butila (1H)

O composto da Preparação 14 e 3-amino-5-fluoro-4-hidróxi-pentanoato de t-butila foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4 e do Exemplo 1 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ 9,14(m, 1H), 8,55(d, 1H), 7,87-7,65(m, 5H), 5,23-4,93(m, 2H), 4,90(m, 1H), 4,05-4,00(dois d, 1H), 3,84-3,79(dois, 1H), 3,06-2,74(m, 2H), 2,40(m, 1H), 1,45 & 1,34(dois s, 9H), 1,12-1,07(m, 6H)

Exemplo 17

Ácido 5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iii)

O composto do Exemplo 16 foi reagido de acordo com o procedimento igual ao do Exemplo 2 para dar o composto do título (o composto do (5S)-isômero, Iii-u, foi obtido de acordo com procedimento igual).

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 9,00 (m, 1H), 8,63-8,48 (m, 2H), 8,08 (d, 1H), 7,97 (m, 1H) 7,87-7,76 (m, 2H), 5,31-4,82 (br, 2H), 4,74 (m, 1H), 3,91(dois d, 1H), 3,73 (dois d, 1H), 2,88-2,61 (m, 2H), 2,33 (m, 1H), 0,98 (m, 6H)

PI0413848

Massa : M+H 416

Preparação 15

5-Etil-3-(4-quinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxilato de etila (VIg)

4-Quinolina-aldeído e 2-etil-acrilato de etila foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao das Preparações 1, 2, e 3 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,95 (d, 1H), 8,89 (m, 1H), 8,11 (d, 1H), 7,83 (m, 1H), 7,71 (m, 1H), 7,65 (d, 1H), 4,27 (m, 2H), 4,01 (d, 1H), 3,67 (d, 1H), 2,10 (m, 2H), 1,31 (t, 3H), 1,02 (t, 3H)

Exemplo 18

3-({[5-etil-3-(4-quinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanoato de t-butila (Ii)

O composto da Preparação 15 e 3-amino-5-fluoro-4-hidróxi-pentanoato de t-butila foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4 e do Exemplo 1 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,97(d, 1H), 8,89 (m, 1H), 8,17 (d, 1H), 7,87-7,64 (m, 3H), 7,36 (d, 1H), 5,21-4,93 (m, 3H), 3,93 (dois d, 1H), 3,48 (dois d, 1H), 3,05-2,78 (m, 2H), 2,24 (m, 1H), 2,03 (m, 1H), 1,46 & 1,33 (dois OH), 1,06 (dois t, 3H)

Exemplo 19

Ácido 3-({[5-etil-3-(4-quinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Ijj)

O composto do Exemplo 18 foi reagido de acordo com o procedimento igual ao do Exemplo 2 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 9,16-9,10 (m, 2H), 8,25-7,86 (m, 5H), 5,20 (br, 2H), 4,75 (m, 1H), 4,00-3,89 (dois d, 1H), 3,73 (dois d, 1H), 2,87-2,71 (m, 2H), 2,26-2,05 (m, 2H), 1,07 (dois t, 3H)

Massa : M+H 402

PI0413948

Preparação 16

3-(Benzotiofen-2-il)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxilato de etila (V1H)

Derivado de benzotiofeno-2-aldeído-oxima (400 mg, 2,26 mmoles) preparado de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 1 foi dissolvido em THF (25 mL), e a mistura foi mantida a 0°C. 2-Etil-acrilato de etila (434 mg, 1,5 Eq) e trietil-amina (7 gotas) foram dissolvidos em THF (5 mL), a solução assim obtida foi lentamente adicionada na mistura acima, e solução de hipoclorito de sódio (6,0 mL) foi adicionalmente adicionada. A solução reacional foi aquecida para a temperatura ambiente e agitada por 4 horas. Água (20 mL) foi adicionada, e a mistura foi extraída com acetato de etila (40 mL x 2), foi lavada com solução aquosa de cloreto de sódio (20 mL), seca sobre sulfato de magnésio, filtrada, e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (acetato de etila 20%-hexano) para dar o composto do título (121 mg, rendimento de 18%).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,82-7,75 (m, 2H), 7,40-7,32 (m, 3H), 4,28 (m, 2H),3,90 (d, 1H),3,31 (d, 1H), 2,07 (m, 2H), 1,33 (t, 3H), 1,01 (t, 3H)

Exemplo 20

3-({[3-(benzotiofen-2-il)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanoato de t-butila (Ij)

O composto da Preparação 16 e 3-amino-5-fluoro-4-hidróxi-pentanoato de ethyl foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4 e do Exemplo 1 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,83-7,68 (m, 3H), 7,42-7,35 (m, 3H), 5,21-4,88 (m, 3H), 3,80 (dois d, 1H), 3,38 (dois d, 1H), 3,03-2,78 (m, 2H), 2,17 (m, 1H), 2,01 (m, 1H), 1,46 & 1,38 (dois s, 9H), 1,03 (dois t, 3H)

Exemplo 21

Ácido 3-({[3-(benzotiofen-2-il)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico

Ácido 3-({[3-(benzotiofen-2-il)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Ikk)

O composto do Exemplo 20 foi reagido de acordo com o procedimento igual ao do Exemplo 2 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 8,63 (m, 1H), 8,11-7,79 (m, 3H), 7,47-7,36 (m, 2H), 5,24-5,06 (m, 2H), 4,73 (m, 1H), 3,79 (dois d, 1H), 3,53 (dois d, 1H), 2,83-2,58 (m, 2H), 2,03-1,86 (m, 2H), 0,91 (dois t, 3H)

Massa : M+H 407

Preparação 17

3-(1,3-Dimetil-1H-indol-2-il)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxilato de etila (VIi)

Derivado de 1,3-dimetil-1H-indol-2-aldeído-oxima (356 mg, 2,07 mmoles) foi dissolvido em dicloro-metano (20 mL), e a mistura foi mantida a 0°C. 2-Etil-acrilato de etila (345 mg, 1,3 Eq) e trietil-amina (6 gotas) foram dissolvidos em dicloro-metano (5 mL), a solução assim obtida foi lentamente adicionada na mistura acima, e solução de hipoclorito de sódio (5,5 mL) foi adicionalmente adicionada. A solução reacional foi aquecida para a temperatura ambiente e agitada por 4 horas. Água (20 mL) foi adicionada, e a mistura foi extraída com dicloro-metano (40 mL x 2), lavada com solução aquosa de cloreto de sódio (20 mL), seca sobre sulfato de magnésio, filtrada, e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (acetato de etila 15%-hexano) para dar o composto do título (230 mg, rendimento de 35%).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,60 (d, 1H), 7,31 (m, 2H), 7,12 (m, 1H), 4,29 (m, 2H), 3,98 (d, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,40 (d, 1H), 2,47 (s, 3H), 2,03 (m, 2H), 1,34 (t, 3H), 1,04 (t, 3H)

Massa : M+H 315

Exemplo 22

(3S)-3-({[3-(1,3-dimetil-(1H-indol-2-il)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanoato de t-butila (Ik)

Os compostos das Preparações 17 e 10 foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4 e do Exemplo 1 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,85-7,79 (m, 1H), 7,57 (m, 1H), 7,37-7,26 (m, 2H), 7,13 (m, 1H), 6,75-6,49 (m, 1H), 5,12-4,90 (m,3H), 3,95 (dois d,1H), 3,89 (dois s,3H), 3,45 (dois d ,1H), 3,03-2,'79 (m, 2H), 2,44 (dois s, 3H), 2,22 (m, 1H), 2,01 (m, 1H), 1,58 & 1,37 (dois s, 9H), 1,05 (dois t, 3H)

Exemplo 23

Ácido (3S)-3-({[3-(1,3-dimetil-1H-indol-2-il)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Ill)

O composto do Exemplo 22 foi reagido de acordo com o procedimento igual ao do Exemplo 22 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 8,67 (br, 1H), 7,61-7,43 (m, 3H), 7,27 (m, 1H), 7,08 (m, 1H), 5,20 (br, 2H), 4,83 (m, 1H), 3,84 (dois s,3H), 3,76 (dois d, 1H), 3,59 (dois d ,1H), 2,91-2,60 (m, 2H), 2,50 (dois s, 3H), 2,07-1,91 (m, 2H), 0,95 (dois t, 3H)

Exemplo 24

3-({[3-(1,3-dimetil-1H-indol-2-il)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanoato de t-butila (Il)

O composto da Preparação 17 e 3-amino-5-fluoro-4-hidróxi-pentanoato de t-butila foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4 e do Exemplo 1 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,79 (m, 1H), 7,60 (m, 1H), 7,32

PI0413948

(m, 2H), 7,13 (m,1H), 5,20-4,90 (m,3H), 3,97-3,89 (m, 4H), 3,46 (dois d, 1H), 3,03-2,77 (m, 2H), 2,21 (m, 1H), 2,01 (m, 1H), 1,46 & 1,38 (dois s, 9H), 1,05 (dois t, 3H)

Exemplo 25

Ácido 3-({[3-(1,3-dimetil-1H-indol-2-il)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Imm)

O composto do Exemplo 24 foi reagido de acordo com o procedimento igual ao do Exemplo 2 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 8,68 (br, 1H), 7,60 (m, 1H), 7,45 (m, 1H), 7,26 (m, 1H), 7,07 (m, 1H), 5,20 (br, 2H), 4,81 (m, 1H), 3,84 (dois s, 3H), 3,76 (dois d, 1H), 3,59 (dois d, 1H), 2,94-2,59 (m, 2H), 2,38 (dois s, 3H), 2,07-1,91 (m, 2H), 0,95 (dois t, 3H)

Massa: M+H 418

Preparação 18

5-Etil-3-(1-naftil-metil)-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxilato de etila (VIj)

1-Naftil-acetaldeído e 2-etil-acrilato de etila foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao das Preparações 1, 2, e 3 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8,1-8,0 (d, J = 8Hz, 1H), 7,8 (d, J = 7,6Hz, 1H,), 7,8-7,7 (d, J =1H), 7,5-7,4 (m, 2H), 7,4-7,3 (m, 2H), 4,1-4,0 (m, 4H), 3,1 (d, J = 17,6Hz, 1H), 2,6 (d, J = 17,6Hz, 1H), 1,8-1,7 (m, 2H), 1,2 (t, 3H), 0,7 (t, 3H)

Exemplo 26

(3S)-3-({[5-etil-3-(1-naftil-metil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanoato de t-butila (Im)

Os compostos das Preparações 18 e 10 foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4 e do Exemplo 1 para dar o composto do título.

PI0413648

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,0 (m, 1H), 7,8 (m, 1H), 7,8 (m, 1H), 7,7 (m, 1H), 7,5 (m, 2H), 7,4-7,3 (m, 2H), 6,7 (m, 1H), 5,0-4,9 (m, 2H), 4,9-4,8 (m, 1H), 4,2-4,0 (m, 2H), 3,1 (dd, J = 1H), 2,9-2,6 (m, 3H), 1,9 (m, 1H), 1,7 (m, 1H), 1,4 (dois s, 9H), 0,8 (m, 3H)

Exemplo 27

Ácido (3S)-3-({[5-etil-3-(1-naftil-metil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Inn)

O composto do Exemplo 26 foi reagido de acordo com o procedimento igual ao do Exemplo 22 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 12,3 (br, 1H), 8,4 (br, 1H), 8,0 (m, 1H), 7,9 (m, 1H), 7,8 (m, 1H), 7,5-7,4 (m, 5H), 5,0 (br, 2H), 4,7 (m, 1H), 4,0 (s, 2H), 3,3 (m, 1H), 3,1 (m, 1H), 2,8 (m, 2H), 2,5 (m, 1H), 1,8 (m, 1H), 1,7 (m, 1H), 0,8 (m, 3H)

MS $[M+H]^+$ 561

Exemplo 28

2,6-Dicloro-benzoato de (3S)-5-(t-butóxi)-3-[({5-etil-3-[2-(1-naftil)-etil]-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-2,5-dioxo-pentila (In)

1-Naftil-propionaldeído e o composto da Preparação 6 foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao das Preparações 1, 2, 3, e 4, e do Exemplo 1 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,00 (d, 1H), 7,85 (m, 1H), 7,76 (m, 2H), 7,57-7,28 (m, 7H), 7,34-7,27 (m, 3H), 5,20-5,05 (m, 2H), 4,94 & 4,88 (dois m, 1H), 3,39-3,27 (m, 3H), 2,97-2,72 (m, 5H), 2,07 (m, 1H), 1,86 (m, 1H), 1,46 & 1,45 (dois s, 9H), 1,00 & 0,96 (dois OH)

Exemplo 29

Ácido (35)-5-[(2,6-dicloro-benzoil)-óxi]-3-[({5-etil-3-[2-(1-naftil)-etil]-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-4-oxo-pentanóico (Ioo)

O composto do Exemplo 28 foi reagido de acordo com o

PI0413648

procedimento igual ao do Exemplo 22 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 8,45 (bd, 1H), 8,06 (d, 1H), 7,90 (d, 1H), 7,77 (d, 1H), 7,60-7,37 (m, 7H), 5,21-5,03 (m, 2H), 4,73 (m, 1H), 3,06 (m, 2H), 2,65 (bd, 4H), 1,91 & 1,74 (dois m, 2H), 0,84 (m, 3H)

Preparação 19

5-etil-3-[(1-naftil-óxi)-metil]-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxilato de etila (VII)

Derivado de 2-nitro-etanol-piranil (veja *Synthesis*, 1993, 12, 1206-1208) e 2-etil-acrilato de etila foram reagidos e o produto resultante foi desprotegido para dar 5-etil-(3-hidróxi-metil)-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxilato de etila (23%). Este composto foi submetido à bromação (CBr_4, PPh_3, 94%) e depois reagido com 1-naftol (NaH, DMF, 82%) para dar o composto do título.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8,20 (m, 1H), 7,81 (d, 1H), 7,55-7,42 (m, 3H), 7,36 (m, 1H), 6,88 (d, 1H), 5,01 (dd, 2H), 4,22 (m, 2H), 3,61 (d, 1H), 3,07 (d, 1H), 1,97 (m, 2H), 1,27 (t, 3H), 0,93 (t, 3H)

Exemplo 30

Ácido (3S)-3[({5-etil-3-[(1-naftil-óxi)-metil]-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino}-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Ipp)

Os compostos das Preparações 19 e 10 foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4 e dos Exemplos 1 e 2 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 8,51 (br, 1H), 8,13 (m, 1H), 7,87 (m, 1H), 7,54-7,38 (m, 5H), 7,02 (m, 1H), 5,18-4,97 (m, 4H), 4,71 (m, 1H), 3,58 (dois d, 1H), 3,21 (dois d, 1H), 2,68 (m, 2H), 1,97 (m, 1H), 1,81 (m, 1H), 0,86 (dois t, 3H)

Massa: M+H 577

PI0413648

Exemplo 31

Ácido (3S)-3-{[(3-{[(4-cloro-1-naftil-óxi]-metil}-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Iqq)

O derivado bromado obtido como um intermediário durante o processo da Preparação 19 e 4-cloro-1-naftol foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 19 para dar 5-etil-3-[(4-cloro-l-naftil-óxi)-metil]-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxilato de etila, que foi então reagido de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4 e dos Exemplos 1 e 2 para dar o composto do título.

^{1}1H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 8,65 (m, 1H), 8,24-8,09 (m, 2H), 7,78-7,35 (m, 4H), 7,06 (m, 1H), 5,17-5,07 (m, 4H), 4,82-4,69 (m, 1H), 3,45 (dois d, 1H), 3,23 (dois d, 1H), 2,83-2,52 (m, 2H), 1,96-1,79 (m, 2H), 0,86 (dois t, 3H)

Massa: M+H 611

Preparação 20

(3S)-3-Amino-4-hidróxi-butanoato de terc-butila

Em ácido N-benzil-óxi-carbonil-β-t-butil-aspártico (3,0 g, 9,28 mmoles) e NMM (1,12 mL, 1,1 Eq) foi adicionado tetra-hidro-furano seco (20 mL) sob atmosfera de nitrogênio. A solução reacional foi mantida a 0°C. Cloro-formiato de isobutila (1,26 mL, 1,05 Eq) foi adicionado, e a mistura foi agitada por cerca de 40 minutos. A lama assim obtida foi filtrada sob nitrogênio, e a solução resultante foi adicionada em solução de $NaBH_4$ (702 mg, 2,0 Eq) [metanol (10 mL)-tetra-hidro-furano seco (20 mL)] a-78°C. A mistura resultante foi lentamente aquecida para a temperatura ambiente (duas horas). A reação foi interrompida por ácido acético (2,3 mL), e a solução reacional foi destilada sob pressão reduzida para remover metanol. O resíduo foi extraído com acetato de etila (50 mL x 2), lavado com água e solução aquosa de cloreto de sódio, seco (Na_2SO_4

PI0413648

anidro), concentrado sob pressão reduzida, e separado-purificado por cromatografia em coluna (acetato de etila-hexano, 1:5) para dar um composto de álcool (2,52 g, rendimento de 88%).

O grupo benzil-óxi-carbonila do composto obtido acima foi removido (Pd/C) sob hidrogênio de cilindro por uma hora para dar o composto do título (rendimento de 100%).

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 4,60 (bs, 1H), 3,21 (m, 2H), 2,96 (m, 1H), 2,41 (dd, 1H), 2,03 (dd, 1H), 1,40 (s, 9H).

Preparação 21

(3S)-4-hidróxi-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-butanoato de terc-butila (XVI)

O composto da Preparação 14 foi reagido de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4 para dar um derivado de ácido carboxílico ativo (VIIf). Uma mistura de citado derivado de ácido carboxílico ativo (VIIf, 224 mg, 0,79 mmol), e derivado de amino-álcoll preparado na Preparação 20 (166 mg, 1,2 Eq) e HATU (390 mg, 1,3 Eq) foi esfriada para 0°C, trietil-amina (0,33 mL, 3,0 Eq) foi adicionada em um solvente de DMF (5 mL), e a mistura resultante foi reagida por duas horas. O solvente foi destilado sob pressão reduzida, e o resíduo foi extraído com acetato de etila (50 mL x 2), lavado com água, solução aquosa de bicarbonato de sódio, e solução aquosa de cloreto de sódio, seco (Na_2SO_4 anidro), concentrado sob pressão reduzida, e purificado por cromatografia em coluna (EA 60-70%/Hex) para dar o composto do título (330 mg, rendimento de 95%).

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,16 (d, 1H), 8,55 (d, 1H), 7,85 (d, 1H), 7,73-7,70 (m, 3H), 7,56 (NH, d, 1H), 4,26 (m, 1H), 4,12 (d, 1H), 4,04 (d, 1H), 3,79 (d, 1H), 3,75 (t, 2H), 2,94 (bs, 1H), 2,57 (m, 2H), 2,41 (m, 1H), 1,10 & 1,07 (dois d, 6H)

PI0413848

Exemplo 32

1-Etil-(2E,4S)-4-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino-2-hexenodioato de 6-(terc-butila) (Iq)

No composto da Preparação 21 (107 mg, 0,24 mmol) e reagente de Dess-Martin (153 mg, 1,5 Eq) foi adicionado dicloro-metano seco (4 mL), e a mistura foi agitada por uma hora na temperatura ambiente e concentrada sob pressão reduzida. No resíduo foram adicionados THF seco (3 mL) e (carboetóxi-metileno)-trifenil-fosforano) (108 mL, 1,3 Eq), e a mistura foi refluxada por duas horas. A mistura reacional foi extraída com acetato de etila (20 mL x 2), lavada com água, solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio e solução aquosa de cloreto de sódio, seca (Na_2SO_4 anidro), concentrada sob pressão reduzida, e preliminarmente purificada por cromatografia preparativa (acetato de etila 40%-hexano) para dar o composto do título (98 mg, 80%) com a razão de diastereômero de 3:1.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) de isômero maior δ 9,15 (d, 1H), 8,54 (d, 1H), 7,86 (d, 1H), 7,74-7,62 (m, 4H), 6,93 (dd, 1H), 6,00 (dd, 1H), 4,98 (m, 1H), 4,19 (qt, 2H), 4,02 (d, 1H), 3,81 (d, 1H), 2,58 (m, 2H), 2,43 (m, 1H), 1,36 (s, 9H), 1,27 (t, 3H), 1,07 & 1,06 (dois d, 6H)

Exemplo 33

Ácido (3S,4E)-6-etóxi-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-6-oxo-4-hexenóico (Irr)

O composto do Exemplo 32 foi reagido de acordo com o procedimento igual ao do Exemplo 2 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(500MHz, MeOD-d_3) de isômero maior δ 9,04 (d, 1H), 8,61 (d, 1H), 8,52 (d, 1H), 7,95 (d, 1H), 7,81-7,68 (m, 3H), 6,94 (dd, 1H), 6,00 (dd, 1H), 5,01 (m, 1H), 4,17 (qt, 2H), 3,90 (d, 1H), 3,82 (d, 1H), 2,71 (d, 2H), 2,39 (septeto, 1H), 1,26 (t, 3H), 1,07 & 1,06 (dois d, 6H)

PI0413848

MS:M+H 454

Exemplo 34

(3S,4E)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-(metil-sulfonil)-4-pentenoato de terc-butila (Ir)

Dicloro-metano anidro (4 mL) foi adicionado no composto do Exemplo 21 (109 mg, 0,25 mmol) e reagente de Dess-Martin (157 mg, 1,5 Eq), e a mistura foi agitada por uma hora na temperatura ambiente e concentrada sob pressão reduzida. A reação foi interrompida por isopropil-álcool (0,5 mL). O sólido foi removido por filtração sob pressão reduzida usando Celite. O filtrado foi extraído com acetato de etila (20 mL x 2), lavado com água, solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio, e solução aquosa de cloreto de sódio, seco (Na_2SO_4 anidro), e concentrado sob pressão reduzida para dar um composto de aldeído (540 mg, rendimento de 99%).

Metil-sulfono-metano-fosfonato de dietila (113 mg, 2,0 Eq, *Synthesis*, 1969, 170) foi dissolvido em THF (3 mL), NaH (60% em óleo mineral, 20 mg, 2,0 Eq) e o composto de aldeído obtido acima foram adicionados, e a mistura foi refluxada por duas horas. Após extração por acetato de etila (20 mL x 2), o extrato foi lavado com água, solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio, e solução aquosa de cloreto de sódio, seco (Na_2SO_4 anidro), concentrado sob pressão reduzida, e purificado por cromatografia preparativa (acetato de etila 60%/hexano) para dar o composto do título (52 mg, 41%) com a razão de diastereômero de 4:1.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) de diastereômero maior δ 9,14 (d, 1H), 8,55 (d, 1H), 7,86 (d, 1H), 7,76-7,65 (m, 4H), 6,92 (dd, 1H), 6,57 (dd, 1H), 5,03 (m, 1H), 4,02 (d, 1H), 3,81 (d, 1H), 2,94 (s, 3H), 2,61 (m, 2H), 2,41 (septeto, 1H), 1,36 (s, 9H), 1,10 & 1,08 (dois conjuntos de d, 6H)

PI0413848

Exemplo 35

Ácido (3S,4E)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-(metil-sulfonil)-4-pentenóico (Iss)

O composto do Exemplo 34 foi reagido de acordo com o procedimento igual ao do Exemplo 2 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(500MHz, MeOD-d_3) de isômero maior δ 9,04 (d, 1H), 8,52 (d, 1H), 7,95 (d, 1H), 7,82-7,69 (m, 3H), 6,90 (dd, 1H), 6,71 (dd, 1H), 5,06 (m, 1H), 3,86 (m, 2H), 2,98 (s, 3H), 2,76 (d, 2H), 2,39 (m, 1H), 1,C8 & 1,06 (dois conjuntos de d, 6H)

MS:M+H 460

Método de preparação dos Exemplos 36-42

Os compostos que foram obtidos pela reação de (iso)quinolino-aldeído (ou 1-ou 2-naftaldeído) e 2-etil-acrilato de etila (ou 2-propil-acrilato de etila) de acordo com o procedimento igual ao das Preparações 1, 2, e 3 (ou Preparações 1 e 16) foram purificados, se necessário, por HPLC preparativa usando coluna OD quiral para isolar os isômeros quirais ativos.

Os isômeros quirais ativos isolados ou os isômeros quirais inativos isolados foram hidrolisados de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4, e os compostos resultantes foram reagidos com 3-amino-5-fluoro-4-hidróxi-pentanoato de t-butila de acordo com o procedimento igual ao dos Exemplos 1 e 2 para dar os compostos do título de seguintes Exemplos 36-42.

Exemplo 36

Ácido 5-fluoro-3-({[(5S)-3-(1-isoquinolinil)-5-propil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Itt);

^{1}H-NMR(500MHz, DMSO-d_6) δ 9,02 (t, 1H), 8,61 (m, 2H), 8,03 (d, 1H), 7,96 (m, 1H), 7,85 (t, 1H), 7,78 (m, 1H), 5,05 (bs, 2H), 4,73 (m, 1H), 3,97-3,92 (dd, 1H), 3,70-3,65 (dois d, 1H), 2,90-2,70 (dois m, 2H), 2,03 (m, 1H), 1,91 (m, 1H), 1,48 (m, 1H), 1,32 (m, 1H), 0,93 (m, 3H)

Massa: M+H 416

PI0413848

Exemplo 37

Ácido 3-({[(5S)-5-etil-3-(1-naftil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iuu)

^{1}H-NMR(500MHz, DMSO-d_6) δ 8,84 (s, 1H), 8,59 (bs, I FL), 8,02 (m, 2H), 7,75 (s, 1H), 7,60 (m, 3H), 5,01 (bs, 2H), 4,73 (m, 1H), 3,87-3,82 (dd, 1H), 3,70-3,65 (dois d, 1H), 2,82-2,73 (dois m, 2H), 2,05 (m, 1H), 1,95 (m, 1H), 0,96 (m, 3H)

Massa: M+H 401

Exemplo 38

Ácido 3-({[(5S)-5-etil-3-(2-quinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Ivv)

^{1}H-NMR (500MHz, DMSO-d_6) δ 8,61 (dd, 1H), 8,41 (m, 1H), 8,02 (m, 3H), 7,79 (t, 1H), 7,65 (t, 1H), 5,22-5,06 (m, 1H), 4,72 (m, 1H), 4,49-4,28 (m, 1H), 3,84 (m, 1H), 3,54 (m, 1H), 2,99-2,54 (dois m, 2H), 2,01 (m, 1H), 1,91 (m, 1H), 0,91 (m, 3H)

Massa : M+H 402

Exemplo 39

Ácido 3-({[(5R)-5-etil-3-(3-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iww)

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ (9,25 & 9,16 (dois s, 1H), 8,03-7,64 (m, 5H), 4,90-4,84 (m, 1H), 4,79-4,54 (m, 2H), 4,01-3,93 (dois d, 1H), 3,54 (d, 1H), 3,03-2,87 (m, 2H), 2,27-2,19 & 2,10-2,01 (dois m, 2H), 1,10-1,06 (m, 3H)

Massa: M+H 402

Exemplo 40

Ácido 3-({[5-etil-3-(8-quinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Ixx)

^{1}H-NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ 8,98 & 8,93 (dois m, 1H), 8,56-8,21 (m, 11-1), 8,03-7,94 (m, 2H), 7,73 (bs, 1H), 7,60 (m, 1H), 7,53-7,48 (dois m, 1H), 4,94-4,64 (m, 3H), 4,27-4,22 (dois-d, 1H), 3,77 (d, 1H), 3,07 &

PT04138A

2,92 (dois m, 2H), 2,31-2,22 (m, 1H), 2,12-2,05 (m, 1H), 1,10 (t, 3H)

Massa: M+H 402

Exemplo 41

Ácido 3-({[5-etil-3-(3-quinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iyy)

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 9,32 & 9,25 (dois d, 1H), 8,16-8,03 (m, 2H), 7,83-7,73 (m, 3H), 7,62-7,55 (m, 1H), 4,95-4,76 (m, 3H), 3,86 (dois d, 1H), 3,45-3,39 (dois d, 1H), 3,17-3,01 (dois m, 1H), 2,90-2,82 (m, 1H), 2,27-2,20 (m, 1H), 2,09-2,00 (m, 1H), 1,10-1,05 (m, 3H)

Massa: M+H 402

Exemplo 42

Ácido 5-Fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(2-quinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico) (Izz)

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ8,24 (m, 1H), 8,14 (m, 1H), 8,04 (d, 1H), 7,88 (d, 1H), 7,79 (m, 1H), 7,65 (m, 1H), 7,51 (bs, 1H), 5,13-4,35 (m, 3H), 4,05-4,00 (dois d, 1H), 3,73 (d, 1H), 3,05-2,82 (m, 2H), 2,42 (m, 1H), 1,10 (m, 6H)

Massa: M+H 416.

Método de preparação dos Exemplos 43-48

Os compostos obtidos pela reação de um aldeído aromático (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996, 6, p.2173, *J. Org. Chem.*, 1978, 43, 1372) e 2-etil-acrilato de etila (ou 2-propil-acrilato de etila) de acordo com o procedimento igual ao das Preparações 1, 2, e 3 (ou Preparações 1 e 16) foram purificados, se necessário, por HPLC preparativa usando coluna OD quiral para isolar os isômeros quirais ativos. Os isômeros quirais ativos isolados ou os isômeros quirais inativos isolados foram hidrolisados de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 4, e os compostos resultantes foram reagidos com 3-amino-5-fluoro-4-hidróxi-pentanoato de t-butila de acordo com o procedimento igual ao dos Exemplos 1 e 2 para dar os compostos do

PI0413848

título de seguintes Exemplos 43-48.

Exemplo 43

Ácido 3-({[5-etil-3-(2-isopropil-fenil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa1)

^{1}H-NMR(500MHz, DMSO-d_6) δ 8,53 (bs, 1H), 7,40 (m, 2H), 7,32 (m, 1H), 7,25 (m, 1H), 5,02 (bs, 2H), 4,72 (m, 1H), 3,60-3,54 (dois d, 1H), 3,46-3,43 (dois d, 1H), 3,40 (m, 1H), 2,78-2,60 (dois m, 2H), 1,95 (m, 1H), 1,85 (m, 1H), 1,14 (s, 6H), 0,88 (m, 3H)

Massa: M+H 393

Exemplo 44

Ácido 3-[({3-[3-(terc-butil)-fenil]-5-etil]-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa2)

^{1}NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 8,56 (dd, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,48 (m, 1H), 7,38 (d, 2H), 5,24-5,12 (q, 1H), 4,76-4,69 (m, 1H), 4,59-4,26 (m, 1H), 3,68 (m, 1H), 3,49-3,43 (dois d, 1H), 2,96-2,56 (dois m, 2H), 1,98 (m, 1H), 1,85 (m, 1H), 1,29 (s, 9H), 0,89 (d, 3H)

Massa: M+H 407

Exemplo 45

Ácido 3-[({3-[4-(terc-butil)-fenil]-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil]-amino]-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa3)

^{1}H-NMR(500MHz, DMSO-d_6) δ 8,52 (bs, 1H), 7,58 (m; 2H), 7,43 (dd, 2H), 5,10 (bs, 2H), 4,71-4,65 (m, 1H), 3,65-3,59 (dois d, 1H), 3,40-3,35 (dois d, 1H), 2,86-2,60 (dois m, 2H), 1,94 (m, 1H), 1,82 (m, 1H), 1,24 (s, 9H), 0,86 (m, 3H)

Massa: M+H 407

Exemplo 46

Ácido 5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(2-isopropil-fenil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iaa4)

^{1}H-NMR(500MHz, $CDCl_3$) δ 7,60-7,53 (m, 1H), 7,41 (m, 2H),

PI0413849

7,27-7,23 (m, 2H), 5,20-4,91 (m, 1H), 4,71 (m, 1H), 4,54-4,42 (m, 1H), 3,69-3,64 (dois d, 1H), 3,45-3,38 (m, 2H), 3,12-2,77 (m, 2H), 2,32 (m, 1H), 1,22 (d, 6H), 1,05 (d, 6H)

Massa: M+H 407

Exemplo 47

Ácido 3-[({(5R)-3-[3-(terc-butil)-fenil]-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa5)

^{1}H-NMR(500MHz, $CDCl_3$) δ 7,69 (s, 1H), 7,48 (d, 1H), 7,41 (d, 1H), 7,35 (1, 1H),4,74-4,50 (m, 3H), 3,69 (d, 1H), 3,40 (d, 1H), 3,06-2,77 (m, 2H), 2,32 (m, 1H), 1,33 (s, 9H), 1,04 (m, 6H)

Massa: M+H 421

Exemplo 48

Ácido 3-{[[(3-[1,1'-bifenil]-3-il-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa6)

3-Bifenil-carboxaldeído (veja *Synthesis*, 2003, 337) foi usado como um material inicial para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(500MHz, DMSO-d_6) δ 8,42 (bs, 1H), 7,87 (d, 1H), 7,73-7,69 (m, 4H), 7,52 (m, 1H), 7,45 (m, 2H), 7,38 (m, 1H), 5,03 (bs, 2H), 4,63 (m, 1H), 3,73-3,57 (m, 2H), 2,67-2,63 (dois m, 2H), 2,22 (m, 1H), 0,89 (m, 6H)

Massa: M+H 441

Método de preparação dos Exemplos 49-59

4-Substituída-piridina-2-carboxaldeídos foram obtidos por um método conhecido em US 6043248, JOC 1982, 47, p4315, e foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao das Preparações 1, 2, e 3 (ou Preparações 1 e 16). Os compostos resultantes foram purificados, se necessário, por HPLC preparativa usando coluna OD quiral para isolar os isômeros quirais ativos. Os isômeros quirais ativos isolados ou os isômeros quirais inativos isolados foram hidrolisados de acordo com o procedimento

PT104340

igual ao da Preparação 4, e os compostos resultantes foram reagidos com 3-amino-5-fluoro-4-hidróxi-pentanoato de t-butila de acordo com o procedimento igual ao dos Exemplos 1 e 2 para dar os compostos do título de seguintes Exemplos 49-59.

Exemplo 49

Ácido 3-({[5-etil-3-(2-piridinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa7)

^{1}H-NMR (500MHz, DMSO-d_6) δ 12,41 (bs, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,59-8,53 (dd, 1H), 7,87 (m, 1H), 7,44 (m, 1H), 5,19-5,04 (dois d, 1H), 4,70 (m, 1H), 4,45-4,27 (m, 1H), 3,67 (m, 1H), 3,42 (m, 1H), 2,95-2,53 (dois m, 2H), 1,96 (m, 1H), 1,86 (m, 1H), 0,85 (m, 3H)

Massa: M+H 352

Exemplo 50

Ácido 3-[({3-[4-(terc-butil)-2-piridinil]-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa8)

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 8,58 (d, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,65 (bs, 1H), 7,45-7,39 (m, 1H), 4,98-4,68 (m, 3H), 3,92 & 3,88 (dois d, 1H), 3,52 & 3,47 (dois d, 1H), 3,05-2,86 (m, 2H), 2,23-2,18 (m, 1H), 2,08-2,00 (m, 1H), 1,38 (s, 9H), 1,05 (t, 3H)

Massa: M+H 403

Exemplo 51

Ácido 3-[({(5R)-3-[4-(terc-butil)-2-piridinil]-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa9)

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 8,58 (d, 1H), 7,88 (d, 1H), 7,61 (bs, 1H), 7,43 (m, 1H), 4,84 (m, 1H), 4,60 (bs, 2H), 3,89-3,82 (dois d, 1H), 3,60-3,55 (dois d, 1H), 3,04-2,86 (m, 2H), 2,38 (m, 1H), 1,38 (s, 9H), 1,07 (m, 6H)

Massa: M+H 422

PI0413848

Exemplo 52

Ácido 3-({[5-etil-3-(4-isobutil-2-piridinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa10)

^{1}H-NMR (500MHz, DMSO-d_6) δ 8,58-8,52 (dd, 1H), 8,49 (s, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,27 (s, 1H), 5,19-5,04 (m, 1H), 4,69 (m, 1H), 4,46-4,29 (m, 1H), 3,68 (m, 1H), 3,41-3,37 (dd, 1H), 2,93-2,46 (m, 4H), 1,95-1,85 (dois m, 3H), 0,86-0,82 (m, 9H)

Massa: M+H 403

Exemplo 53

Ácido 3-({[3-(4-acetil-2-piridinil)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa11)

^{1}H-NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ,79 (d, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,76 (d, 1H), 7,46 (bs, 1H), 4,84-4,40 (m, 3H), 3,90-3,85 (dois d, 1H), 3,51-3,46 (dois d, 1H), 3,04-2,84 (m, 2H), 2:65 (s, 3H), HHHkdkdk2,16 (m, 1H), 2,02 (m, 1H), 1,03 (m, 3H)

Massa: M+H 394

Exemplo 54

Ácido 3-({[3-(4-ciclo-propil-2-piridinil)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa12)

^{1}H-NMR (500MHz, DMSO-d6) δ 12,39 (bs, 1H), 8,41 (t, 1H), 7,56 (d, 1H), 7,12 (m, 1H), 5,19-5,04 (m, 1H), 4,72-4,66 (m, 1H), 4,46-4,27 (m, 1H), 3,69-3,63 (m, 1H), 3,39-3,35 (dois d, 1H), 2,80-2,74 (m, 1H), 2,63-2,52 (m, 1H), 2,00-1,80 (m, 3H), 1,06 (m, 2H), 0,86-0,80 (m, 5H)

Massa: M-i-H 392

Exemplo 55

Ácido 3-({[3-(4-ciclo-pentil-2-piridinil)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa13)

^{1}H-NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ 8,50 (d, 1H), 7,67 (m, 2H), 7,26 (m, 1H), 4,88-4,82 (m, 1H), 4,65 (bs, 2H), 3,88-3,81 (dois d, 1H), 3,45-3,41

PT04138A

(dois d, 1H), 3,05 (m, 1H), 2,96-2,80 (m, 2H), 2,20-2,12 (m, 3H), 2,02-1,96 (m, 1H), 1,83 (m, 2H), 1,72 (m, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,01 (t, 3H)

Massa: M41 420

Exemplo 56

Ácido 3-({[(5R)-3-(4-ciclo-pentil-2-piridinil)-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa14)

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 8,58 (m, 1H), 7,74 (d, 1H), 7,63 (bs, 1H),7,38-7,32 (dd, 1H), 4,88-4,81 (m, 1H), 4,53 (bs, 2H), 3,87-3,79 (dois d, 1H),

3,56-3,53 (dois d, 1H), 3,12-3,04 (m, 1H), 3,02-2,85 (m, 2H), 2,38 (m, 1H), 2,16 (m, 2H), 1,88 (m, 2H), 1,78 (m; 2H), 1,65 (m, 2H), 1,07 (m, 6H)

Massa: M+H 434

Exemplo 57

Ácido 3-({[3-(4-ciclo-hexil-2-piridinil)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa15)

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 8,61 (m, 1H), 7,75 (d, 1H), 7,64 (bs, 1H), 7,39-7,33 (dd, 1H), 4,86-4,53 (dois m, 3H), 3,87 (t, 1H), 3,50-3,45 (dd, 1H), 3,05-2,85 (dois m, 2H), 2,63 (m, 1H), 2,22 (m, 1H), 2,03 (m, 1H), 1,93-1,80 (dois m, 5H), 1,44 (m, 5H), 1,05 (t, 3H)

Massa: M+H 434

Exemplo 58

Ácido 3-({[5-etil-3-(5,6,7,8-tetra-hidro-l-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa16)

^{1}H-NMR (500MHz, DMSO-d_6) δ 8,60-8,53 (dd, 1H), 8,30 (d, 1H), 7,15 (d, 1H), 5,20-5,05 (m, 1H), 4,74-4,66 (m, 1H), 4,45-4,25 (m, 1H), 3,75-3,68 (m, 1H), 3,47-3,41 (m, 1H), 2,94-2,88 (m, 2H), 2,80-2,72 (m, 3H), 2,62-2,53 (m, 1H), 1,99-1,93 (m, 1H), 1,88-1,80 (m, 1H), 1,71-1,69 (m, 4H),

PI0413848

0,88-0,84 (m, 3H)

Massa: M-FH 406

Exemplo 59

Ácido [5-fluoro-3-({[5-isopropil.3-(4-fenil-2-piridinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iaa17)

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 8,68 (d, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,68 (m, 1H), 7,58 (m, 1H), 7,54-7,43 (m, 5H), 4,86-4,60 (m, 3H), 3,92-3,87 (dois d, 1H), 3,62 (d, 1H), 3,09-2,86 (m, 2H), 2,39 (m, 1H), 1,11-1,06 (m, 6H)

Massa: M+H 442

Método de preparação dos Exemplos 60-63

Ácido (2S)-4-(terc-butóxi)-2-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil-amino)-4-oxo-butanóico [obtido por reação de copulação de Composto (VIII) com Asp (O-t-Bu)-OMe e hidrólise] foi reagido de acordo com o procedimento igual ao da Preparação 5 para dar o derivado de bromo-metil-cetona ((3S)-5-bromo-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanoato de terc-butila), Este derivado de bromo-metil-cetona foi reagido com ácido difenil-fosfínico em KF/DMF (veja a Preparação 5) para dar o derivado de difenil-fosforil-óxi-metil-cetona, que foi então reagido de acordo com o procedimento igual ao do Exemplo 2 para dar o composto do título (Composto do Exemplo 60).

Os compostos dos seguintes Exemplos 61-63 foram obtidos a partir de 1-fenil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-ol, 3-benzil-4-hidróxi-2(5H)-furanona, ou ácido butírico de acordo com o procedimento igual ao acima.

Exemplo 60

Ácido (3S)-5-[(difenil-fosforil)-óxi]-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iaa18)

^{1}H-NMR (500MHz, DMSO-d_6) δ 8,92 (m, 1H), 8,58 (m, 1H),

8,05 (m, 1H), 7,94 (m, 1H), 7,81 (m, 1H), 7,75-7,72 (m, 3H), 7,57 (m, 3H), 7,49 (m, 4H), 7,35 (m, 2H), 4,90-4,65 (dois m, 3H), 3,79-3,75 (dois d, 1H), 3,69-3,67 (dois d, 1H), 2,65 (dois m, 2H), 2,22 (m, 1H), 0,84 (m, 6H)

Massa: M+H 614

Exemplo 61

Ácido (3S)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-([1-fenil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-il]-óxi}-pentanóico (Iaa19)

^{1}H-NMR (500MHz, DMSO-d_6) δ 8,95 (m, 1H), 8,83 (d, 1H), 8,57 (m, 1H), 8,03 (d, 1H), 7,92 (d, 1H), 7,80 (m, 1H), 7,74 (m, 1H), 7,65 (d, 1H), 7,57 (m, 1H), 7,51-7,34 (m, 3H), 6,27 (s, 1H), 5,29-5,15 (m, 2H), 4,76 (m, 1H), 3,92-3,88 (m, 1H), 3,75-3,69 (m, 1H), 2,84-2,60 (m, 2H), 2,33 (m, 1H), 0,96 (m, 6H)

Massa: M+H 624

Exemplo 62

Ácido (3S)-5-[(4-benzil-5-oxo-2,5-di-hidro-3-furanil)-óxi-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil} amino)-4-oxo-pentanóico (Iaa20)

^{1}H-NMR (500MHz, DMSO-d_6) δ 8,97 (t, 1H), 8,58 (d, 1H), 8,04 (d, 1H), 7,92 (d, 1H), 7,81 (m, 1H), 7,73 (m, 1H), 7,23-7,07 (m, 6H), 7,51 (m, 1H), 4,79-4,65 (m, 3H), 3,92-3,87 (dois d, 1H), 3,74-3,68 (dois d, 1H), 2,82-2,58 (m, 2H), 2,31 (m, 1H), 0,95 (m, 6H)

Massa: M+H 586

Exemplo 63

Ácido (3S)-5-(isobutiril-óxi)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iaa21)

^{1}H-NMR (500MHz, DMSO-d_6) δ 12,39 (bs, 1H), 8,96 (t, 1H), 8,73 (m, 1H), 8,58 (dd, 1H), 8,04 (d, 1H), 7,92 (d, 1H), 7,81 (t, 1H), 7,73 (m,

PI0413846

1H), 4,78 (m, 2H), 4,68 (m, 1H), 3,87 (t, 1H), 3,73-3,68 (dois d, 1H), 2,79-2,60 (dois m, 2H), 2,56 (m, 1H), 2,31 (m, 1H), 1,05 (d, 3H), 0,95 (m, 9H)

Massa: M+H 484

Exemplo 64

Ácido (3S)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-hexenóico (Iaa22)

Derivado de amida de Weinreb de ácido (2S)-4-(terc-butóxi)-2-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-butanóico (derivado condensado com N,O-dimetil-hidroxil-amina) e brometo de vinil-magnésio foram reagidos, e o composto resultante foi reagido de acordo com o procedimento igual ao do Exemplo 2 para dar o composto do título.

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ 12,27 (bs, 1H), 8,95 (t, H), 8,74-8,67 (dois d, 1H), 8,58 (m, 1H), 8,04 (d, 1H), 7,92 (d, 1H), 7,83-7,72 (m, 2H), 6,47 (m, 1H), 6,22-6,11 (dois dd, 1H), 5,71-5,62 (dois dd, 1H), 4,77 (m, 1H), 3,90-3,79 (m, 1H), 3,72-3,64 (m, H), 2,82 (m, H), 2,62-2,49 (m, 1H), 2,30 (m, 1H), 0,94 (m, 6H)

Massa: M+H 410

Preparação 22

(3S)-3-Amino-4-hidróxi-5-(2-piridinil-óxi)-pentanoato de t-butila (VIIIf)

O derivado de bromo-metil-cetona X (3,2 g, 7,93 mmoles), um intermediário na Preparação 5, foi dissolvido em benzeno (30 mL), Ag_2CO_3 (2,62 g, 1,2 Eq) e 2-hidróxi-piridina (0,93 g, 1,2 Eq) foram adicionados, e a mistura foi agitada sob refluxo a 80°C por 3 dias. A mistura reacional foi filtrada através de Celite, concentrada sob pressão reduzida, e purificado por cromatografia em coluna para dar o derivado de 2-piridinil-óxi-metil-cetona (XIf) (466 mg, rendimento de 14%).

O derivado de 2-piridinil-óxi-metil-cetona (XIf) (227 mg,

PI0413848

0,548 mmol) assim obtido foi dissolvido em um solvente de tetra-hidro-furano/metanol (3:2 v/v) (10 mL), $NaBH_4$ (43 mg, 2,0 Eq) foi adicionado a 0°C, e a mistura foi agitada por 30 minutos na temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de solução saturada de cloreto de amônio, e a solução reacional foi concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi extraído com acetato de etila, lavado com água e solução aquosa de cloreto de sódio, seco (Na_2SO_4 anidro), e concentrado sob pressão reduzida para dar o Composto (XIIf) (230 mg) no qual o grupo cetona foi reduzido para grupo hidroxila.

O grupo benzil-óxi-carbonila do composto preparado acima foi removido (Pd/C) sob hidrogênio de cilindro por 40 minutos para dar o composto do título (155 mg, 99%).

Método de preparação dos Exemplos 65-66

Composto VIIf (ou VIIu) e VIIIf foram reagidos de acordo com o procedimento igual ao dos Exemplos 1 e 2 para dar os compostos do título dos Exemplos 65-66. Aqui, VIIu representa ácido 5-etil-3-(2-isopropil-fenil)-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxílico.

Exemplo 65

Ácido (3S)-3-({[(5*R*)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-diidro-5-isoxazolil]-carbonil}-arnino)-4-oxo-5-(2-piridinilóxi)-pentanóico (Iaa23)

^{1}H-NMR (500MHz, MeOH-d_4) δ 9,04 (d, 1H), 8,50 (d, 1H), 7,95 (d, 1H), 7,81 (d, 1H), 7,77 (t, 1H), 7,69 (t, 1H), 7,59 (m, 1H), 6,85-6,80 (m, 2H), 6,67 (bs, 1H), 5,07 (bs, 1H), 4,95 (t, 1H), 4,84 (m, 1H), 3,94-3,79 (Abq, 2H), 2,92-2,80 (m, 2H), 2,39 (m, 1H), 1,09 (m, 6H)

Massa: M+H 491

Exemplo 66

Ácido (3S)-3-({[5-etil-3-(2-isopropil-fenil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-arnino)-4-oxo-5-(2-piridil)-pentanóico (Iaa24)

^{1}H-NMR (500MHz, DMSO-d_6) δ 8,71 (bs, 1H), 8,02-7,94

PI0413848

(dois bs, 1H), 7,71-7,64 (m, 1H), 7,42-7,18 (m, 4H), 6,96-6,90 (dois t, 1H), 6,85-6,80 (dois d, 1H), 4,99 (bs, 2H), 4,86-4,78 (m, 1H), 3,58 (dois d, 1H), 3,48 (dois d, 1H), 3,36 (m, 1H), 2,81-2,61 (m, 2H), 2,05-1,80 (dois m, 2H), 1,14-1,03 (m, 6H), 0,93-0,88 (m, 3H)

Massa: M+H 468,21

Exemplo 67

Trifluorometano-sulfonato de 2-{[(3S)-4-carbóxi-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-2-oxo-butil]-óxi}-1-metil-piridínio (Iaa25)

O intermediário ((3S)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2-piridinil-óxi)-pentanoato de t-butila (49 mg, 90 μmoles) obtido após a reação de oxidação de Dess-Martin no Exemplo 65 foi dissolvido em dicloro-metano (2 mL), trifluorometil-sulfonato de metila (1,1 Eq, 10,1 μL) foi adicionado, e a mistura foi agitada por um dia na temperatura ambiente. Após concentrado sob pressão reduzida, o resíduo foi submetido ao procedimento igual ao do Exemplo 2 para dar o composto do título (60 mg).

^{1}H-NMR (500MHz, DMSO-d_6) δ 9,00-8,91 (m, 2H), 8,76-8,57 (m, 2H), 8,42 (m, 1H), 8,04 (m, 1H), 7,93 (m, 1H), 7,80 (m, 1H), 7,75 (m, 1H), 7,54 (m, 1H), 5,77-5,48 (m, 2H), 4,85-4,81 (m, 1H), 4,00 (s, 3H), 3,94-3,69 (m, 2H), 2,87-2,60 (m, 2H), 2,33 (m, 1H), 0,98 & 0,94 (dois d, 6H)

Massa: M+ 505,20

Exemplo 68

Trifluorometano-sulfonato de 2-{[(3S)-4-carbóxi-3-({[5-etil-3-(2-isopropil-fenil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-2-oxo-butil]-óxi}-1-metil-piridínio (Iaa26)

O intermediário ((3S)-3-({[(5R)-5-etil-3-(2-isopropil-fenil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2-piridinil-óxi)-pentanoato de t-butila (55 mg, 0,105 mmoles) obtido após a reação de

PI0413948

oxidação de Dess-Martin no Exemplo 66 foi dissolvido em dicloro-metano (2 mL), trifluorometil-sulfonato de metila (1,1 Eq, 13 μL) foi adicionado, e a mistura foi agitada por um dia na temperatura ambiente. Após concentrado sob pressão reduzida, o resíduo foi submetido ao procedimento igual ao do Exemplo 2 para dar o composto do título (59 mg, rendimento de 94%).

^{1}H-NMR (500MHz, DMSO-d_6) δ 8,80-8,73 (dois d,1H), 8,65 (m, 1H), 8,45-8,38 (m, 1H), 7,56- 7,51 (m, 2H), 7,43-7,31 (m, 3H), 7,24-7,12 (m, H), 5,72-5,48 (m, 2H), 4,91 (m, 1H), 4,01 & 3,99 (dois s, 3H), 3,64 (dois d, 1H), 3,48 (dois d, 1H), 3,42 (m, 1H), 2,90-2,62 (m, 2H), 2,05-1,80 (dois m, 2H), 1,15-1,03 (m, 6H), 0,93-0,88 (m,3H).

Massa: M+ 482,17

Método de preparação dos Exemplos 69-70

Derivado de oxima de 5-cloro-1-metil-1H-indol-2-aldeído ou 1,5-dimetil-1H-indol-2-aldeído foi reagido com 3-amino-5-fluoro-4-hidróxi-pentanoato de t-butila de acordo com o procedimento igual ao das Preparações 1, 17, 4 e dos Exemplos 1, 2 para dar o composto do título dos Exemplos 69-70.

Exemplo 69

Ácido 3-({[3-(5-cloro-1-metil-1H-indol-2-il)-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa27)

^{1}H-NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ 7,59 (s, 1H), 7,46-7,39 (dois d, 1H), 7,30-7,23 (m, 3H), 5,01 (m, 1H), 4,75-4,46 (m, 2H), 4,02 (d, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,71 (d, 1H), 2,95 (m, 1H), 2,77 (m, 1H), 2,35 (m, 1H), 1,04 (m, 6H)

Massa: M+H 452

Exemplo 70

Ácido 3-({[3-(1,5-dimetil-1H-indol-2-il)-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa28)

^{1}H-NMR (500MHz, $CCDCl_3$) δ 7,48 (bs, 1H), 7,39 (d, 1H), 7,23-7,14 (m, 3H),

4,76 (m, 1H), 4,70-4,50 (m, 2H), 4,07-4,02 (dois d, IH), 3,99,

PI0413948

3,94 & 3,93 (três s, 3H), 3,75-3,48 (m, 1H), 2,94-2,82 (dois m, 1H), 2,46-2,43 (dois s, 3H), 2,34 (m, 1H), 1,05 (m, 6H)

Massa: M+H 432

Preparação 23

Resolução de ácido (5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxílico

Ácido 5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxílico foi dissolvido em acetona (190 mL) por aquecimento a 60°C, e (S)-a-metil-benzil-amina (14,5 mL , 112 mL) foi adicionada. A mistura reacional foi esfriada para a temperatura ambiente e agitada por 4 horas. O precipitado resultante foi filtrado e lavado três vezes com acetona (40 mL).

O sal de (S)-a-metil-benzil-amina de ácido (5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxílico foi dissolvido na mistura (150 mL) de acetona e água (4:1) por aquecimento a 90°C, esfriado para a temperatura ambiente, e agitado por 3 horas. O precipitado resultante foi filtrado e lavado com acetona (40 mL) três vezes para dar o sal de (S)-a-metil-benzil-amina de ácido (5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxílico puro (12,8 g, 24,3%, e.e. de 99,8%).

A pureza óptica de ácido (5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazol-carboxílico foi estimada pelo uso de coluna ChiralCel OD (4,6 mm x 250 mm x 5 mm). A mistura de n-hexano/isopropanol/ácido trifluoro-acético (92/8/0,1) foi usada como a fase móvel na vazão de fluxo de 1 mL/min, a temperatura da coluna foi 40°C, e o comprimento de onda de detecção foi 225 nm. Os dois isômeros ópticos foram observados em tempos de retenção de 7,8 min (isômero R) e 21,1 min (isômero S), respectivamente.

Exemplo 71

Resolução de composto (Iii1)

1) Isolamento de composto SEMENTE

Os dois diastereômeros do Exemplo 16 foram separados pelo

PI0413948

uso de coluna de sílica de cromatografia líquida preparativa (diâmetro de 40 mm, DYNAMAX-100Å). A mistura de n-hexano/etanol/ácido trifluoro-acético (4000/32/2) foi usada como a fase móvel na vazão de fluxo de 50 mL/min, e o diastereômero desejado foi coletado com a razão de 99:1 durante o tempo de retenção de 62-66 min no comprimento de detecção de 227 nm (os dois diastereômeros foram amplamente eluídos com vazão modificada até 86 min). O diastereômero assim obtido de razão de 99:1 foi desprotegido e usado como a semente para a resolução.

A pureza óptica foi estimada pelo uso de coluna Atlantis C_{18} (4,6 mm x 250 mm x 5 mm). A mistura de acetonitrila/água/ácido trifluoro-acético foi utilizada como a fase móvel na vazão de fluxo de 1 mL/min de acordo com o seguinte gradiente:

t = 0 min, 0:100:0,1

3 min, 20:80:0,1

50 min, 100:0:0,1

Sob o comprimento de onda de detecção de 227 nm, os dois isômeros ópticos foram observados nos tempos de retenção de 36,6 min (3R,5R-isômero) e 37,1 min (3S,5S- isômero), respectivamente.

(3S,5R-isômero): (3S)-5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanoato de t-butila

^{1}H-NMR(500MHz, $CDCl_3$) δ 9,13 (d, 1H), 8,55 (d, 1H), 7,85 (d, 1H), 7,78-7,65 (m, 4H), 5,22-5,02 (dois m, 2H), 4,90 (m, 1H), 4,02 (d, 1H), 3,80 (d, 1H), 2,92-2,88 (dd, 1H), 2,79-2,75 (dd, 1H), 2,41 (m, 1H), 1,34 (s, 9H), 1,09 (m, 6H)

Massa: M+H 472

(3R,5R-isômero): (3R)-5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanoato de t-butila

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ 9,14 (d, 1H), 8,56 (d, 1H), 7,87 (d, 1H), 7,77-7,64 (m, 4H), 5,25-5,00 (dois q, 2H), 4,90 (m, 1H), 4,03 (d, 1H), 3,82 (d, 1H), 2,93 (dd, 1H), 2,77 (dd, 1H), 2,42 (m, IH), I,35 (s, 9H), 1,1I (m, 6H)

Massa: M+H 472

Ácido (3S)-5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iii-1)

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ 9,07 (d, 1H), 8,57 (d, 1H), 7,89 (d, 1H), 7,78-7,69 (m, 3H), 7,69 (d, 1H), 4,88-4,79 (m, 2H), 4,67 (bs, 1H), 4,07 (d, 1H), 3,81 (d, 1H), 3,03-2,93 (m, 1H), 2,91-2,82 (m, 1H), 2,43 (m, 1H), 1,12 (m, 6H)

Massa: M+H 416

Ácido (3R)-5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iii-2)

^{1}H-NMR(500MHz, $CDCl_3$) δ 9.07(d, 1H), 8.55(d, 1H), 7.87(d, 1H), 7.75-7.68(m, 3H), 7,52 (bs, 1H), 5,20-4,35 (m, 3H), 4,02 (d, 1H), 3,80 (d, 1H), 3,13-2,90 (m, 2H), 2,39 (m, 1H), 1,08 (m, 6H).

Massa: M+H 416

2) Recristalização

Ácido (3S)-5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iii-1)

5-Fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanoato de t-butila bruto (366 g) foi dissolvido em cloreto de metileno (1,9 kg) e esfriado para 0°C. Trietil-silano (235 g) e ácido trifluoro-acético (1,88 kg) foram adicionados e agitados por uma hora a 0°C. A mistura reacional foi destilada sob pressão reduzida, redissolvida em acetato de etila (2,4 kg), e o pH foi ajustado para 5,2 pela

PI0413848

adição de solução aquosa de hidróxido de sódio 2 N (3,1 L). A camada orgânica foi separada e a camada aquosa foi extraída uma vez com acetato de etila (2,4 kg). A camada orgânica combinada foi destilada sob pressão reduzida para remover o solvente, o resíduo resultante foi dissolvido em metil-t-butil-éter (530 g), e quantidade pequena de ácido (3S)-5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico cristalino foi adicionada. Após agitação por 16 horas na temperatura ambiente, o precipitado resultante foi filtrado e lavado com a mistura 9:1 de metil-t-butil-éter e n-hexano (210 mL).

O ácido (3S)-5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico assim obtido foi dissolvido em acetato de etila (240 mL) por aquecimento a 50°C, n-hexano (240 mL) foi lentamente adicionado, e gradialmente esfriado para a temperatura ambiente. Após agitação por 24 horas na temperatura ambiente, o precipitado resultante foi filtrado e lavado com a mistura 1:1 de acetato de etila e n-hexano (30 mL) para dar o composto do título (Iii-1, 46,0 g, 3S/3R = 94/6). A pureza óptica foi estimada usando coluna Luna (4,6 mm x 250 mm, 5 mm, C_{18}). A mistura de acetonitrila/NH_4OAc 20 mM (pH 6) (30/70) foi usada como a fase móvel na vazão de fluxo de 1 mL/min. Sob o comprimento de onda de detecção de 227 nm, os dois isômeros ópticos foram observados em tempos de retenção de 8,0 min (isômero 3R) e 9,0 min (isômero 3S), respectivamente.

Experimento 1

Determinação do efeito inibitório de caspase

Caspase-1 e caspase-8 conhecidas como cisteína proteases na forma de $\alpha_2\beta_2$ foram expressadas, purificadas, e ativadas por modificação de um método conhecido em Thornberry, N. A. *et al.*, *Nature*, **1992**, *356*, 768. Thornberry, N. A. *Methods in Enzymology*, **1994**, *244*, 615. Walker, N. P. C. *et al.*, *Cell*, **1994**, *78*, 343, e caspase-9 também foi purificada por um método

PI0413948

semelhante, e a atividade inibitória contra elas foi testada. Descrevendo resumidamente, subunitades p10 e p20 (Thornberry, N. A. *et al.*, *Nature*, **1992**, *356*, 768) foram expressadas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de troca aniônica e em coluna de níquel para dar caspase-1, caspase-8 e caspase-9. O substrato fluorescente AcYVAD-AFC para a caspase-1, AcDEVD-AFC para a caspase-8, e AcLEHF-AFC para a caspase-9 assim obtidas foram usados para determinar a atividade específica dos inibidores sintetizados. A reação enzimática foi realizada a 25°C com várias concentrações de inibidores em uma solução tampão contendo HEPES 50 mM (pH 7,50), 10% (p/v) de sacarose, 0,1% (p/v) de CHAPS, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, e DTT 10 mM na presença de AcYVAD-AFC a 50 μM para a caspase-1 a 10 nM, AcDEVD-AFC a 50 μM para a caspase-8 a 2,1 nM, e AcLEHF-AFC a 150 μM para a caspase-9a 200 nM. As constantes inibitórias K_i e K_{obs} dos inibidores foram determinadas pela medição da velocidade de reação com o lapso de tempo usando um espectrômetro fluorescente e pela obtenção da constante de velocidade inicial. K_i foi calculada da Plotagem de Linewaver Burk, e K_{obs} da seguinte Equação 1.

Equação 1

$$K_{obs} = -\ln (1-A_t/A_{oo})/t$$

na qual

A_t significa a taxa de clivagem (%) no tempo t, e

A_{oo} significa a taxa de clivagem (%) máxima.

Espectrômetro Fluorescente Spectra MAX GeminiXS de Molecular Device Co. foi usado no comprimento de onda de excitação de 405 nm e no comprimento de onda de emissão de 505 nm.

A atividade inibitória *in vivo* dos inibidores foi determinada ao se submeter a célula Jurkat (ATCC TIB-152) à apoptose usando anticorpos Farmaceuticamente aceitáveis (Upstate Biotech 05-021) e pela detecção da mudança de cor de acordo com o método WST-1 conhecido em Francoeur A.

PI0413848

M. e Assalian A. (1996) *Biochemica* **3**, 19-25 para observar a quantidade de células Jurkat vivas quando as células foram tratadas pelo inibidor. Espectrômetro Spectra MAX 340 de Molecular Device Co. foi utilizado no comprimento de onda de absorbância de 440 nm.

Tabela 1

Com. No.	Caspase-I K_{obs} /[I] (M^{-1} min^{-1})	Caspase-8 K_{obs} /[I] (M^{-1} min^{-1})	Caspase-9 K_{obs} /[I] (M^{-1} min^{-1})	Célula Jurkat IC_{50} (μM)
Icc	1,9 ES	3,3 E4		22,5
Idd	3,1 ES	1,9 E5		4,25
Iee		1,8 E5		32,6
Iff		5,0 E5		1,2
Igg	2,7 E6	1,5 E6	3,2 E5	0,17
Iii	1,1 E6	1,3 E7	2,0 E5	0,1
Iii-u		1,9 E5		0,71
Iii-1		2,3 E7		
Iii-2		4,7 E5		
Ijj		1,9 E5		4,7
Ikk		1,2 E5		1,1
Ill		1,3 ES		39,2
Imm		1,6 ES		2,0
Inn		2,6 E5		6,5
Ioo		2,0 E4		50
Ipp	2,3 E6	1,7 ES		3,5
Iqq	3,3 E6	1,4 E5		37
Irr				Sem atividade
Iss				Sem atividade
Itt		4,3E5		0,16
Iuu		2,9E5		0,98
Ivv		1,SE6		0,15
Iww		1 AE6		1,9
Ixx		4,0E4		26,5
Iyy		3,1 ES		31,2
Izz		4,2E5		1,25
Iaal		1,8E5		0,33
Iaa2		3,2E5		0,56
Iaa3		1,4E5		2,65
Iaa4		5,OE5		0,67
Iaa5		10E5		0,3
Iaa6		2,0E5		2,45
Iaa7		4,4E4		2,27
Iaa8		4,5E5		0,70
Iaa9		2,3E5		1,24
Iaa10		1,5E5		1,02
Iaal 1		6,4E4		31
Iaal2		1,9E5		0,70

PT04138A

Iaal3		ME5		0,35
Iaa14		4,1E5		0,79
Iaal5		4,3E5		0,72
Iaa 16		6,2E5		0,73
Iaal7		1,8E5		1,14
Iaal8		5,2E5		1,5
Iaal9		1,6E4		Sem atividade
Iaa20		3,7E4		Sem atividade
Iaa21		Sem atividade		Sem atividade
Iaa22		Sem atividade		
Iaa23		2,9E4		Sem atividade
Iaa24		Sem atividade		
Iaa25		1,7E5		Sem atividade
Iaa26		3,1E4		Sem atividade
Iaa27		8,2E5		1,3
Iaa28		1,8E6		0,6

* Composto Iii-u é a forma (5S) do Composto Iii.

Experimento 2

Efeito terapêutico para hepatite aguda induzida por LPS em camundongo

Etapa 1) Preparação de amostra de sangue

Camundongos fêmeas Balb/c (6 semanas, Charles River Laboratory, Osaka, Japão) foram mantidos sob as condições de 22°C, umidade relativa de 55%, e ciclo de luz-escuridão de 12 horas. Alimento e água foram fornecidos *ad libitum*. Em solução salina livre de pirogênio foram dissolvidos LPS (lipopolissacarídeo) e D-galactosamina em concentrações de 0,4 mg/mL e 280 mg/mL, respectivamente, e sua mistura 1:1 foi injetada em camundongos na quantidade de 5 mL/kg. Imediatamente após a injeção de LPS e galactosamina, veículo (uma mistura de PEG400 : etanol : Twenn 80 = 15:75:2,5 diluída cinco vezes com solução salina) no qual o composto de teste estava dissolvido ou o veículo sozinho ou injetado intraperitonealmente nos camundongos. Após 8 horas da injeção de droga, amostras de sangue foram obtidas de seus corações.

Etapa 2: Determinação da atividade de aminotransferase de plasma

A atividade de ATL de plasma foi determinada para as

PT04138A

amostras de sangue obtidas na Etapa 1 usando o kit de ensaio de ATL (Asan Pharm. Co., Seul, Coréia) de acordo com a instrução do fabricante. Como um resultado, pareceu que a injeção de LPS e de D-galactosamina aumenta rapidamente a atividade de ATL em plasma, e os compostos de teste inibem a atividade enzimática aumentada em uma maneira dependente de dose. Baseado nestes resultados, valores de ED_{50} dos compostos de teste foram calculados usando o programa de computador Prism de GraphPad Co. para dar 0,01-10 mg/kg.

Experimento 3

Efeito inibitório contra fibrose hepática em ratos SD

Etapa 1) Indução de fibrose hepática e administração

Ratos machos Sprague-Dawley (6 semanas, Korea Biolink) foram mantidos sob as condições de 22°C, umidade relativa de 55%, e ciclo de luz-escuridão dc 12 horas. Alimento e água foram fornecidos *ad libitum*. Para a ligação de duto biliar, os ratos foram anestesiados por inalação de halotano 1%, o abdome dos ratos foi aberto, os ditos biliares distal e proximal foram ligados, e a parte entre os sítios de ligação foi cortada, 2 mL de solução salina foram injetados, e o abdome foi suturado.

Composto de teste (Iii) foi oralmente administrado em uma dosagem de 3 mg/kg ou de 10 mg/kg duas vezes ao dia. Isto é, o composto foi dissolvido em um co-solvente (PEG400 : etanol : Tween 80 = 15:7,5, 2,5), diluído cinco vezes com tampão fosfato (pH 7,4), e administrado. Ao grupo de controle foi administrada a solução sem o composto de teste. A administração foi feita por 1 semana após 1 semana da ligação do duto biliar.

Etapa 2): Preparação de seção de tecido e coloração com vermelho Sirius

Após a administração, os ratos foram mortos. Os fígados foram fixados por formalina neutra a 10% e uma seção de parafina de espessura de 5 μm foi preparada e corada por vermelho Sirius a 0,1% (Direc

PI0413848

red 80, Sigma). A seção de tecido foi investigada por um microscópio óptico para observar as fibras de colágeno coradas de vermelho, e os resultados são representados na Figura 1.

Experimento 4

Teste inibitório contra apoptose durante a estagnação biliar em ratos SD

O composto de teste (Iii) foi administrado aos ratos SD cujos dutos biliares foram ligados de acordo com o procedimento da Etapa 1 do Experimento 3. Após 2 semanas da operação, os ratos foram mortos. Os fígados foram fixados por formalina neutra a 10% e uma seção de parafina de espessura de 5 μm foi preparada. Coloração com TUNEL foi realizada usando o Kit de Detecção *In Situ* de ApopTag Peroxidase (Chemicon) de acordo com a instrução do fabricante. Mais do que 10 sítios do tecido de fígado corado com TUNEL foram fotografados em magnificações de 200 sem qualquer recobrimento, cujo resultado foi mostrado na Figura 2. O número de células sofrendo de apoptose em cada grupo de teste foi contado e representado na seguinte Tabela 2. Na seguinte tabela, a operação Simulada significa o caso no qual o duto biliar foi exposto mas não ligado, e a operação BDL significa o caso no qual apenas o veículo foi administrado após a ligação do duto biliar.

Tabela 2

Efeito inibitório do composto (Iii) contra apoptose de célula hepática durante a estagnação biliar

(unidade: células positivas para TUNEL/campo)

Operação Simulada	Operação BDL	BDL+Composto (Iiii) 3 mg/kg	BDL+Composto (Iiii) 10 mg/kg
0,76 ± 0,15	16,7 ± 2,75	4,12 ± 1,3	5,66 ± 1,34

Conclusão

A inibição efetiva de apoptose (inibição de 75%) pelo Composto (Iii) foi mostrada pela coloração com TUNEL em um modelo

PI0413948

estabelecido pela indução de fibrose hepática por intermédio de estagnação biliar. Em adição, a coloração com Vermelho Sirius mostrou uma fibrose severa no grupo de controle, mas quase nenhuma fibrose no grupo tratado com o Composto (Iii). Este resultado demonstra o efeito inibitório do Composto (Iii) contra fibrose hepática em ratos, e assim é esperado que o Composto (Iii) possa exibir a atividade farmacológica de suprimir a cirrose hepática pela inibição da apoptose de célula hepática em aplicação clínica. A aplicação pode ser expandida não apenas à cirrose hepática por estagnação biliar, mas também a várias doenças hepáticas nas quais está incluída a cirrose hepática devido à apoptose.

Experimento 5

Efeito antiflogístico em ratos

Ratos machos SD (6 semanas, Oriente), foram mantidos sob as condições de 22°C, umidade relativa de 55%, e ciclo de luz-escuridão de 12 horas. Alimento e água foram fornecidos *ad libitum*. Antes da indução de edema, o volume de pata de cada rato foi medido por pletismômetro. Antes da indução de edema, veículo (uma mistura de PEG400 : etanol : Tween 80 = 15:7,5, 2,5), diluído dez vezes com tampão fosfato) no qual o composto de teste está dissolvido ou o veículo sozinho foi oralmente administrado aos ratos. Carragenano (gama) foi dissolvida na concentração de 1% em solução salina e subcutaneamente injetada no pata traseira direita dos ratos na dosagem de 100 μL. Após 3 horas, o volume da pata direita foi medido novamente por pletismômetro. O efeito do composto de teste foi mostrado pela inibição de edema (%) (veja a Tabela 3). A inibição de edema (%) foi calculada de acordo com a seguinte Equação 2.

Equação 2

Inibição de edema (%) = 100 x (média de volume de pata aumentado no grupo administrado com veículo - Volume de pata aumentado

PI0413048

no grupo tratado com composto de teste)/(Média do volume de pata aumentado no grupo administrado com veículo).

Tabela 3

Efeito de inibição de edema do Composto (Iii)

Efeito de inibição de edema (%)		
Dosagem (mg/kg)	Média	SEM
3	2,3	7,7
30	20,7	9,7
100	22,7	2,6

Experimento 6

Efeito terapêutico para artrite reumática em ratos

Ratos fêmeas Lewis (7 semanas, Charles River, Japão) foram mantidos sob as condições de 22°C, umidade relativa de 55%, e ciclo de luz-escuridão de 12 horas. Alimento e água foram fornecidos *ad libitum*. Colágeno de tipo II (bovino) foi dissolvido em ácido acético 0,05 M em uma concentração de 2 mg/mL a 4°C. 0,1 mL da solução assim emulsificada foi subcutaneamente injetado na cauda dos ratos Lewis. Após 7 dias, a solução emulsificada foi novamente injetada na mesma maneira. Da data na qual o segunda solução emulsificada foi injetada, veículo (uma mistura de PEG400 : etanol : Tween 80 = 15:7,5, 2,5), diluído dez vezes com tampão fosfato) no qual o composto de teste está dissolvido ou o veículo sozinho foi oralmente administrado aos ratos todos os dias. No Dia 14 da primeira injeção de solução emulsificada contendo colágeno, o volume de pata traseira direita foi medido novamente por pletismômetro (veja a Tabela 4). A inibição de edema (%) foi determinada pela seguinte Equação 3.

Equação 3

Inibição de edema (%) = 100 x (média de volume de pata aumentado no grupo administrado com veículo no Dia 14 - Volume de pata aumentado no grupo tratado com composto de teste no Dia 14)/(Média do volume de pata aumentado no grupo administrado com veículo no Dia 14).

PI0413948

Em adição, o valor p foi calculado pelo teste t de Student a partir do volume de pata aumentado no Dia 14 para confirmar a significância.

Tabela 4

Efeito de inibição de edema de pata

Dosagem de Composto (Iii) (mg/kg)	Volume de pata (mL)				Efeito de inibição de edema (%)	
	Dia 0		Dia 14		Dia 14	
	Média	SEM	Média	SEM	Média	SEM
0	1,115	0,036	1,975	0,257	-	
10	1,134	0,032	1,394*	0,089	69,8	10,8

vapor de p = 0,032

No teste de edema de pata em ratos, o Composto (Iii) mostrou um efeito de inibição de edema dependente de dose de cerca de 2%, 21%, e 23% em uma dosagem de 3 mg/kg, 30 mg/kg, e 100 mg/kg, respectivamente. No modelo de artrite reumatóide, o edema de pata foi diminuído significativamente (decréscimo de cerca de 70%) no grupo administrado com Composto (Iii) no Dia 14 quando o grupo de controle negativo mostrou o edema máximo. Portanto, é considerado que o Composto (Iii) possui um efeito inibitório contra o progresso de inflamação em um modelo de doença inflamatória, e assim pode tratar as doenças inflamatórias auto-imunes.

Experimento 7

Comparação de efeito com o composto conhecido

Composto (Iii) de acordo com a presente invenção e LB84068MP (Composto 68) conhecido em PCT/KR00/01047 (WO 01/21600) foram testados e os resultados são mostrados na seguinte Tabela 5.

Tabela 5

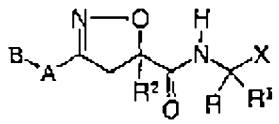
	LB84068MP	Iii
K_{obs}/[I] contra caspase-8	1,02 E6 ($m^{-1}min^{-1}$)	1,30 E7 ($m^{-1}min^{-1}$)
IC_{50} (célula Jurkat)	1,6 μM	0,1 μM ou menor
ED_{50} (LPS + Gal)	0,99 mg/kg	0,01 mg/kg
Solubilidade (pH = 7,44 fosfato)	0,93 mg/mL ou menor	7,8 g/mL

Como pode ser visto da Tabela 5 acima, o Composto (Iii) de

acordo com a presente invenção mostrou uma atividade inibitória aumentada em 10 vezes ou mais contra caspase-8 e célula Jurkat comparado com LB84068MP, e em cerca de 100 vezes contra modelo de hepatite aguda físico-quimicamente induzida (camundongo). Também, em relação às propriedades físico-químicas, o composto mostrou solubilidade aumentada, e assim pode ser facilmente usado como uma injeção. Isto é, o composto da presente invenção mostra efeitos elevadamente mais melhorados do que o composto de comparação LB84068MP em ambos os aspectos de atividade e de propriedades físico-químicos.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de ser de seguinte fórmula (1):



(I)

em que

I) R representa H,

II) R^1 representa $-CH_2COOH$ ou $-CH_2COOR^3$ (R^3 = SAC), ou $-CH_2CONHSO_2R^4$ (R^4 = SAC),

III) R^2 representa H, ou -SAC, -Ar, ou $-(CH_2)_nOR^7$ (R^7 = -SAC, -SCAC, -Ar, ou -SCAC-Ar, e n = 1 ou 2),

IV) A representa $-(CH_2)_n-$ (n = 0-4), $-O-(CH_2)_n-$ (n = 0-4),

V) B representa H, -SAC, -SCAC, -Ar, -SAC-Ar,

VI) X representa X representa $-COCH_2N_2$, $-COCH_2F$, $-COCH_2Cl$, $-COCH_2Br$, $-COCH_2I$, $-COCH_2OAr$, $-COCH_2OCOAr$ ou $-COCH_2SR^{17}$ (R^{17} é -SAC, -SCAC, -Ar ou -SAC-Ar).

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser selecionado do seguinte grupo:

(1) ácido (3S)-5-[(2,6-dicloro-benzoil)-óxi]-3-{[[5-metil-3-fenil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-4-oxo-pentanóico (Iaa);

(2) ácido (3S)-3-{[(5-metil-3-fenil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-4-oxo-5-fenóxi-pentanóico (Ibb);

(3) ácido (3S)-3-{[(5-etil-3-fenil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Icc);

(4) ácido (3S)-3-({[5-etil-3-(1-naftil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Idd);

(5) ácido (3S)-3-({[5-etil-3-(2-naftil)-4,5-di-hidro-5-

isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Iee);

(6) ácido (3S)-3-({[5-etil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-arnino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Iff)

(7) ácido 3-({[5-etil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Igg);

(8) 3-({[5-etil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanoato de etila (Ihh);

(9) ácido 5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iii);

(10) ácido 3-({[5-etil-3-(4-quinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Ijj),

(11) ácido 3-({[3-(benzotiofen-2-il)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Ikk);

(12) ácido (3S)-3-({[3-(1,3-dimetil-1H-indol-2-il)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Ill);

(13) ácido 3-({[3-(1,3-dimetil-1H-indol-2-il)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil] carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Imm);

(14) ácido (3S)-3-({[5-etil-3-(1-naftil-metil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Inn);

(15) ácido (35)-5-[(2,6-dicloro-benzoil)-óxi]-3-[({5-etil-3-[2-(1-naftil)-etil]-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-4-oxo-pentanóico (Ioo);

(16) ácido (3S)-3[({5-etil-3-[(1-naftil-óxi)-metil]-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino}-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Ipp);

(17) ácido (3S)-3-{[(3-{[(4-cloro-1-naftil-óxi]-metil}-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-4-oxo-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-fenóxi)-pentanóico (Iqq);

(18) ácido (3S,4E)-6-etóxi-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-6-oxo-4-hexenóico (Irr);

(19) ácido (3S,4E)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-(metil-sulfonil)-4-pentenóico (Iss);

(20) ácido 5-fluoro-3-({[(5S)-3-(1-isoquinolinil)-5-propil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Itt);

(21) ácido 3-({[(5S)-5-etil-3-(1-naftil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iuu);

(22) ácido 3-({[(5S)-5-etil-3-(2-quinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Ivv);

(23) ácido 3-({[(5R)-5-etil-3-(3-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iww);

(24) ácido 3-({[5-etil-3-(8-quinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Ixx);

(25) ácido 3-({[5-etil-3-(3-quinolinil.)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iyy);

(26) ácido 5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(2-quinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Izz);

(27) ácido 3-({[5-etil-3-(2-isopropil-fenil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa1);

(28) ácido 3-[({3-[3-(terc-butil)-fenil]-5-etil]-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa2);

(29) ácido 3-[({3-[4-(terc-butil)-fenil]-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil]-amino]-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa3);

(30) ácido 5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(2-isopropil-fenil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iaa4);

(31) ácido 3-[({(5R)-3-[3-(terc-butil)-fenil]-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa5);

(32) ácido 3-{[[(3-[1,1'-bifeni1]-3-il-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil)-carbonil]-amino}-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa6);

(33) ácido 3-({[5-etil-3-(2-piridinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa7);

(34) ácido 3-[({3-[4-(terc-butil)-2-piridinil]-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa8);

(35) ácido 3-[({(5R)-3-[4-(terc-butil)-2-piridinil]-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil}-carbonil)-amino]-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa9);

(36) ácido 3-({[5-etil-3-(4-isobutil-2-piridinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa10);

(37) ácido 3-({[3-(4-acetil-2-piridinil)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa11);

(38) ácido 3-({[3-(4-ciclo-propil-2-piridinil)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa12);

(39) ácido 3-({[3-(4-ciclo-pentil-2-piridinil)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa13);

(40) ácido 3-({[(5R)-3-(4-ciclo-pentil-2-piridinil)-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa14);

(41) ácido 3-({[3-(4-ciclo-hexil-2-piridinil)-5-etil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa15);

(42) ácido 3-({[5-etil-3-(5,6,7,8-tetra-hidro-l-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa16);

(43) ácido [5-fluoro-3-({[5-isopropil.3-(4-fenil-2-piridinil)-

4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iaa17);

(44) ácido (3S)-5-[(difenil-fosforil)-óxi]-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iaa18);

(45) ácido (3S)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-([1-fenil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-5-il]-óxi}-pentanóico (Iaa19);

(46) ácido (3S)-5-[(4-benzil-5-oxo-2,5-di-hidro-3-furanil)-óxi-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}amino)-4-oxo-pentanóico (Iaa20);

(47) ácido (3S)-5-(isobutiril-óxi)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iaa21);

(48) ácido (3S)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-hexenóico (Iaa22);

(49) ácido (3S)-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolinil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-5-(2-piridinil-óxi)-pentanóico (Iaa23);

(50) ácido (3S)-3-({[5-etil-3-(2-isopropil-fenil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-arnino)-4-oxo-5-(2-piridinil-óxi)-pentanóico (Iaa24);

(51) trifluorometano-sulfonato de 2-{[(3S)-4-carbóxi-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-2-oxo-butil]-óxi}-1-metil-piridínio (Iaa25);

(52) trifluorometano-sulfonato de 2-{[(3S)-4-carbóxi-3-({[5-etil-3-(2-isopropil-fenil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-2-oxo-butil]-óxi}-1-metil-piridínio (Iaa26);

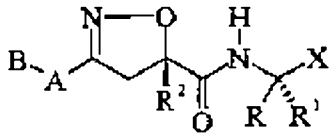
(53) ácido 3-({[3-(5-cloro-1-metil-1H-indol-2-il)-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa27);

(54) ácido 3-({[3-(1,5-dimetil-1H-indol-2-il)-5-isopropil-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-5-fluoro-4-oxo-pentanóico (Iaa28); e

(55) ácido (3S)-5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iii-1).

3. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser ácido (3S)-5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iii).

4. Composto, caracterizado pelo fato de ser de seguinte fórmula (1a):



(Ia)

na qual A, B, R, R^1, R^2, e X são definidos como descrito na reivindicação 1.

5. Composto de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de ser ácido (3S)-5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico (Iii-1).

6. Processo para preparar o composto (Iii-1) como definido na reivindicação 5, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de dissolver uma mistura de ácido (3S)-5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico e ácido (3R)-5-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil}-amino)-4-oxo-pentanóico em metil-t-butil-éter, adicionar uma quantidade pequena de ácido (3S)-5-fluoro-3-({[(5R)-fluoro-3-({[(5R)-5-isopropil-3-(1-isoquinolil)-4,5-di-hidro-5-isoxazolil]-carbonil)-amino)-4-oxo-pentanóico cristalino como um material de semente para dar um cristal, e recristalizar este cristal do sistema de solventes de acetato de etila/n-hexano.

7. Composição terapêutica para prevenir inflamação e

apoptose, caracterizada pelo fato de compreender o composto de fórmula (1) inibidor de caspase, ou seu sal, ou seu estereoisômero como definido na reivindicação 1 como um ingrediente ativo juntamente com o veículo farmaceuticamente aceitável.

8. Composição de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de compreender o composto (Iii) de acordo com a reivindicação 3 como um ingrediente ativo.

9. Composição de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de compreender o composto (Iii-1) de acordo com a reivindicação 5 como um ingrediente ativo.

10. Processo para preparar a composição terapêutica para prevenir inflamação e apoptose como definida na reivindicação 7, caracterizado pelo fato de compreender misturar o composto de fórmula (1) inibidor de caspase, seu sal, ou seu estereoisômero como definido na reivindicação 1 com veículo farmaceuticamente aceitável.

11. Uso do composto de fórmula (1), ou de seu sal, ou de seu estereoisômero, como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser para o preparo de um medicamento para prevenir inflamação e apoptose.