

(11) *Número de Publicação:* **PT 91099 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C07K007/06 A	C07K005/02 B
A61K037/64 B	C07D213/40 B
C07D207/10 B	C07C271/18 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.07.07	(73) <i>Titular(es):</i> SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.07.08 US 216178 1989.03.10 US 321937	ONE FRANKLIN PLAZA, P.O. BOX 7929 PHILADELFA, PENNSYLV. 19101 US
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1990.02.08	(72) <i>Inventor(es):</i> WILLIAM FRANCIS HUFFMAN US BRIAN WALTER METCALF US GEOFFREY BAINBRIDGE DREYER US THOMAS DOWNING MEEK US MICHAEL LEE MOORE US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 07/94 1994.07.12	(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE PÉPTIDOS DE LIGAÇÃO A PROTEASES DE RETROVÍROS, DOS SEUS INTERMEDIÁRIOS E DE COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS

(57) *Resumo:*

[Fig.]

69 585

SKB CASE 14415

PATENTE Nº. 91 099

"Processo de preparação de péptidos de ligação a proteases de retrovírus, dos seus intermediários e de composições farmacêuticas"

para que

SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION, preten
de obter privilégio de invenção em Por
tugal.

R E S U M O

O invento refere-se a um processo de preparação de péptidos que mimetizam a ligação do substrato de poliproteína da protease de retrovírus às proteases virais e que são úteis no ensaio da actividade da protease ou na inibição da actividade da protease e no tratamento da doença viral, o qual compreende, (a) acoplar os resíduos de aminoácidos apropriados, (b) remover facultativamente quaisquer grupos protectores, e (c) modificar facultativamente o terminal amino ou carboxilo do péptido.

MEMÓRIA DESCRITIVAANTECEDENTES

Os retrovírus, isto é, vírus dentro da família dos Retroviridae, são uma classe de vírus que transportam o seu material genético como ácido ribonucleico em vez de como ácido desoxirribonucleico. Também conhecidos como vírus "tumor-ARN", a sua presença foi associada com um grande número de doenças em humanos e animais. Acredita-se que eles sejam os agentes causadores de estados patológicos associados com infecção pelo vírus do sarcoma de Rous (RSV), vírus da leucemia murina (MLV), vírus do tumor mamário de ratinho (MMTV), vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da leucemia bovina (BLV), vírus do macaco Mason-Pfizer (MPMV), vírus do sarcoma símio (SSV), síndrome de imunodeficiência adquirida símia (SAIDS), vírus linfotrópico T humano (HTLV-I, -II) e vírus da imunodeficiência humana (HIV-1, HIV-2), o qual é o agente etiológico da SIDA (síndrome de imunodeficiência adquirida) e de complexos relacionados com a SIDA, e muitos outros. Embora os patógenos tenham sido, em muitos destes casos, isolados, não foi desenvolvido nenhum método eficaz para o tratamento deste tipo de infecção. Entre estes vírus, o HTLV e o HIV foram especialmente bem caracterizados.

Embora diferentes em detalhe, todos os retrovírus são bastante semelhantes na estrutura global. A partícula de vírus extracelular é composta por uma membrana exterior erizada com glicoproteínas virais, um núcleo de proteínas estruturais e um genoma de ácido ribonucleico de cadeia simples. O genoma retroviral tem uma organização regional característica, referida como estrutura 5'-gag-pol-env-3', em que a região gag codifica para as proteínas estruturais do núcleo, a região pol codifica para certos enzimas virais críticos tais como a transcriptase inversa, integrase e protease, e a região env codifica para as glicoproteínas do envólucro. A replicação viral ocorre apenas dentro das células hospedeiras e é dependente das funções celulares do hospedeiro. A produção de proteínas virais funcionais é crítica para esta replicação. A síntese proteica é efectuada pela translação dos

-3-

quadros de leitura abertos para as construções de poliproteína, correspondentes aos quadros de leitura de gag, pol e env, que são processadas, pelo menos em parte, por uma protease viral nas proteínas funcionais. A actividade proteolítica determinada pela protease viral no processamento das poliproteínas não pode ser fornecida pelo hospedeiro e é essencial para o ciclo de vida dos retrovírus. Na realidade, demonstrou-se que os retrovírus que não possuem a protease ou que contêm uma sua forma mutacionada, não possuem infecciosidade. Ver Katoh e colab., Virology, 145, 280-92 (1985), Crawford, e colab., J. Virol., 53, 899-907 (1985) e Debouk, e colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 8903-6 (1987). A inibição da protease retroviral representa, portanto, um método de tratamento para a doença retroviral.

As proteases retrovirais não foram bem caracterizadas. Tanto as proteases como os seus substratos poliproteicos são recuperados a partir das partículas do virião com um rendimento muito baixo. Para avaliar a sua actividade é necessário estipular um substrato para expressar a actividade proteolítica. A utilização do substrato natural para analisar a actividade proteolítica apresenta dificuldades experimentais na produção, purificação e quantificação do substrato e dos seus produtos de hidrólise. Muitas destas desvantagens podem ser ultrapassadas pela utilização de um pequeno péptido, o qual pode ser produzido sinteticamente e na forma pura, para analisar a actividade proteolítica. É, portanto, altamente desejável e vantajoso produzir pequenos péptidos que podem ser utilizados como substratos para estas enzimas.

As proteases são enzimas que clivam as ligações peptídicas nas proteínas e polipéptidos. Estão presentes na maior parte dos sistemas biológicos, onde cumprem funções quer metabólicas quer reguladoras. O seu papel no metabolismo é o de hidrolisar os polipéptidos em péptidos mais pequenos e, em última análise, nos seus aminoácidos constituintes. O seu papel na regulação biológica é difuso e é o tema de diversas investigações. Ver, como um exemplo, Biological Functions of Proteinases, editado por H. Holzer e H. Tschesche, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1979).

-4-

Um dos seus papéis reguladores é o de processamento pós-translacional de polipéptidos para formar proteínas, enzimas e mediadores. Essencial para a sua função reguladora é a sua capacidade para actuar selectivamente sobre os polipéptidos. Esta selectividade é constituída por dois factores, 1.) a sua capacidade para actuar sobre substratos específicos, e 2.) a sua capacidade para hidrolisar apenas as ligações peptídicas específicas. A um nível estrutural, esta especificidade de substrato é o resultado da sequência de aminoácidos primária, a conformação local resultante do polipéptido substrato e dos aminoácidos que formam a ligação peptídica no sítio de clivagem.

A informação da sequência concernente ao suposto sítio de clivagem nos substratos naturais poliproteicos está disponível para diversas retrovirais. Contudo, os substratos peptídicos para as proteases retrovirais são, até agora, desconhecidos. Além disso, dado que as interacções de ligação do substrato natural são desconhecidas, é muitas vezes difícil predizer qual o tamanho do péptido que será satisfatório. De forma semelhante, dado que a conformação de um polipéptido grande pode ser significativamente diferente da de um péptido pequeno, é difícil predizer qual a sequência de aminoácidos que se ligará de forma satisfatória num péptido pequeno.

O estudo de proteínas virais pelo sequenciamento de aminoácidos sugeriu alguns resíduos de aminoácidos comuns dentro da região de clivagem para as proteases retrovirais. Por exemplo, Casey, e colab., J. Virol., 55, 417-23 (1985) revela a sequência terminal amino da proteína gag p24 madura do HIV-1 como sendo Pro-Ile-Val-Gln-Asn, indicando que o resíduo de prolina está envolvido no sítio de clivagem. diMarzo Veronese, e colab., Science, 231, 1289-90 (1986) propuseram um sítio de clivagem (indicado por *) para a transcriptase inversa (RT) de Thr-Leu-Asn-Phe*-Pro, o qual atribui à RT um terminal amino de prolina. Debouck, e colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 8903-06 (1987), sugeriram que a protease do HIV-1 é autocatalítica e revelaram que o terminal amino da protease contém a sequência Pro-Gln-Ile-Thr-Leu. Pearl, e colab., Nature, 328, 482 (1987) compararam alguns substratos poli

peptídicos precursores do núcleo para um vasto grupo de retrovírus e sugeriram uma preferência da sequência para clivagem no X-Pro para as proteases retrovirais, em que X é geralmente quer um aminoácido aromático (Phe, Tyr) quer um aminoácido grande e hidrofóbico (Met, Leu). É ainda sugerido que esta sequência é geralmente flanqueada, em qualquer dos lados, por um aminoácido pequeno e hidrofóbico.

A estrutura de muitas proteases retrovirais foi examinada, baseada primariamente na sua estrutura de aminoácidos predita a partir da sua estrutura nucleotídica. Elas são geralmente codificadas na extremidade 5' da região pol, na extremidade 3' da região gag ou entre (mas fora de quadro com) as duas regiões. Yasunaga e colab., FEBS Lett., 199, 2, 145-49 (1986) revelam boa homologia de sequência entre famílias de retrovírus e demonstraram diversas sequências altamente conservadas entre os membros da família dos lentivírus e da subfamília HTLV/BLV de retrovírus.

Métodos para expressar as proteases retrovirais em E. coli foram revelados, para o vírus HIV-1, por Debouck e colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8903-06 (1987) e Graves, e colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2449-53 (1988).

Até à data foi empreendida pouca caracterização bioquímica das proteases retrovirais. Contudo, foi sugerido por Katoh, e colab., Nature, 329, 654-6 (1987), que certas proteases retrovirais podem ser proteases ácidas. Isto é baseado na observação que a pepstatina, um conhecido inibidor da protease ácida, é um inibidor fraco das proteases retrovirais associadas com o vírus da leucemia bovina, o vírus da leucemia murina de Moloney e o vírus da leucemia de células T humanas.

Métodos para a produção de inibidores da protease de proteases retrovirais foram revelados por Kettner, e colab., Patente dos EUA Nº. 4 636 492 e Kettner, e colab., Patente dos EUA Nº. 4 644 055. Desta maneira, tri- e tetra-péptidos, os quais correspondem substancialmente à sequência de aminoácidos do sítio de clivagem do substrato da protease, são modificados para passarem a possuir, no terminal C, uma porção halometilcetona. A halo

-6-

metilcetona, sendo uma porção reactiva, é pressuposta reagir com a protease uma vez que a ligação do péptido se tenha efectuado.

Apesar de não relacionados com as proteases retrovirais, Umezawa e colab., isolaram inibidores de um grupo diferente de proteases por exame de filtrados de culturas microbianas. Ver Proteinase Inhibitors: Medical and Biological Aspects, ed. Katunuma e colab., págs. 3-15 (1983), Japan Sci. Soc. Press. Tokyo/Springer-Verlag, Berlin. Alguns destes inibidores peptídicos, tais como a bestatina, amastatina e pepstatina, contêm aminoácidos incomuns que não são aminoácidos α . Acredita-se que estes inibidores actuam por apresentarem uma ligação carbono-carbono, não hidrolisável, à enzima proteolítica no sítio cissil.

A pepstatina, um inibidor pentapeptídico isolado a partir de uma cultura de Streptomyces, demonstrou inibir uma larga variedade de proteases ácidas, e atraíu a atenção devido à sua capacidade para inibir a renina e a pepsina. Ver Umezawa, H. e colab., J. Antibiot., Tóquio, 23, 259-263 (1970). A pepstatina contém o aminoácido incomum, ácido (3S,4S)-4-amino-3-hidroxi-6-metil-heptanóico (AHMHA), denominado estatina, em duas posições do pentapéptido. Este aminoácido incomum não é um aminoácido α , mas acredita-se que funciona como mímico dipeptídico e apresenta à enzima uma ligação carbono-carbono em vez de uma ligação peptídica cissil. Os derivados peptídicos contendo estatina têm sido utilizados para inibir as proteases humanas renina e pepsina. (Ver Cazaubon e colab., Patente dos EUA Nº. 4 481 192).

Foram feitas modificações da pepstatina, por diversos grupos, para otimizar a sua actividade em relação à inibição da renina. Rich e colab., J. Med. Chem., 23, 27-33 (1980) mostraram que a quiralidade da estatina incorporada na pepstatina é importante para a ligação e fizeram modificações da estatina para provar a relação entre a estrutura e a actividade inibidora. Assim, o ácido (3S,4S)-4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanóico (AHPPA) apresentou actividade semelhante à da estatina quando incorporado nos péptidos em lugar da estatina.

Outros "análogos dipeptídicos", que contêm uma ligação

-7-

carbono-carbono em lugar de uma ligação peptídica, foram sintetizados e estudados por diversos grupos. Muitas destas tentativas envolveram estruturas estreitamente relacionadas com a estatina por modificação do carbono portador do grupo hidroxilo e do carbono adjacente. Assim, derivados oxo, derivados diamino, derivados di-hidroxi (Thaisrivongs e colab., J. Med. Chem., 30, 976-82 (1987)), derivados desidroxi (Rich, e colab., J. Med. Chem., 23, 27-33 (1980)), derivados contendo fósforo (Grannousis, e colab., J. Med. Chem., 1603-09 (1987)) e derivados flúor (Fearon e colab., J. Med. Chem., 30, 1617-22 (1987) e Thaisivongs e colab., J. Med. Chem., 20, 2080-87 (1986)) da estatina foram todos sintetizados e a sua capacidade para inibir a renina ou a pepsina foi relatada. Foram também descritas variações, nas quais um grupo metileno substituído é inserido α em relação ao grupo carboxilo da estatina, para inibição da renina (Luly e colab., Requerimento de Patente Europeia EP 229667; Fung e colab., Requerimento de Patente do PCT PCT/WO 88/05050; Evans, Patente dos E.U.A. 4 655 055; Hester e colab., Requerimento de Patente Europeia EP 173481). Estes "análogos dipeptídicos" apresentaram capacidades variáveis para inibir a renina e a pepsina, sendo a sua actividade específica também dependente das porções adjacentes, as quais medeiam a ligação a estas enzimas. Os métodos sintéticos empregues nestas revelações são aqui incorporadas por referência.

Existe uma necessidade para péptidos que ligam proteases retrovirais a fim de testar a actividade da protease e para fornecer inibidores da actividade da protease retroviral para uso farmacêutico. Tal uso farmacêutico proporciona tratamento para doenças que, até agora, foram não tratáveis.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento compreende o processo para a preparação de péptidos, daqui em diante representados como fórmula (I), que se ligam a proteases retrovirais. Num ponto, estes péptidos são úteis como substratos para analisar a actividade da protease. Noutro ponto, estes péptidos são inibidores das proteases virais e são úteis para o tratamento de doenças relacionadas com a infec

-8-

ção por estes agentes.

Este invento refere-se também ao processo para a preparação de uma composição farmacêutica, a qual compreende um composto de fórmula (I) e um veículo farmacêuticamente aceitável.

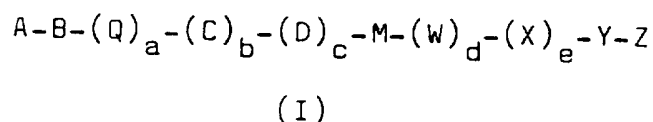
Este invento compreende ainda um método para o tratamento da doença viral, o qual compreende a administração, a um mamífero necessitando do mesmo, de uma quantidade eficaz de um composto de fórmula (I),

Este invento fornece ainda um método para analisar a actividade da protease viral.

Ainda num outro aspecto, este invento refere-se ao processo para a preparação de um composto, representado daqui em diante como fórmula (IIb), o qual pode ser utilizado como um intermediário na preparação dos péptidos de fórmula (I), que torna o péptido resistente à degradação pela protease viral.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Os péptidos de acordo com este invento são ilustrados pela fórmula (I):



em que:

A é BocNH, CbzNH, H, R'R"N, R"CONR' ou DnsNH, ou se a, b e c são 0 e Y é uma ligação covalente, então A é H, Boc, Cbz, R" ou R"CO;

B é um ou mais aminoácidos D ou L, β -Ala ou é uma ligação covalente;

C e D são iguais ou diferentes e são Glx, Asx, Ala, β -Ala, Arg, Gly, Ile, Leu, Lys, Ser, Thr, Val, Met ou His;

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

W é Pro ou Δ 3-desidro-Pro;

-9-

X é Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Met, Lys, Glx ou Asx;

Y é um ou mais aminoácidos D ou L, ou é uma ligação covalente;

Z é $\text{CO}_2\text{R}'''$, $\text{CONR}'\text{R}'''$, COR' , CH_2OH , $\text{CH}_2\text{NR}'\text{R}'''$ ou H, ou se d e e são 0 e Y é uma ligação covalente, Z é OR''' ou $\text{NR}'\text{R}'''$;

a, b, c, d e e são, cada um deles independentemente, 0 ou 1, desde que c e e não sejam simultaneamente 0;

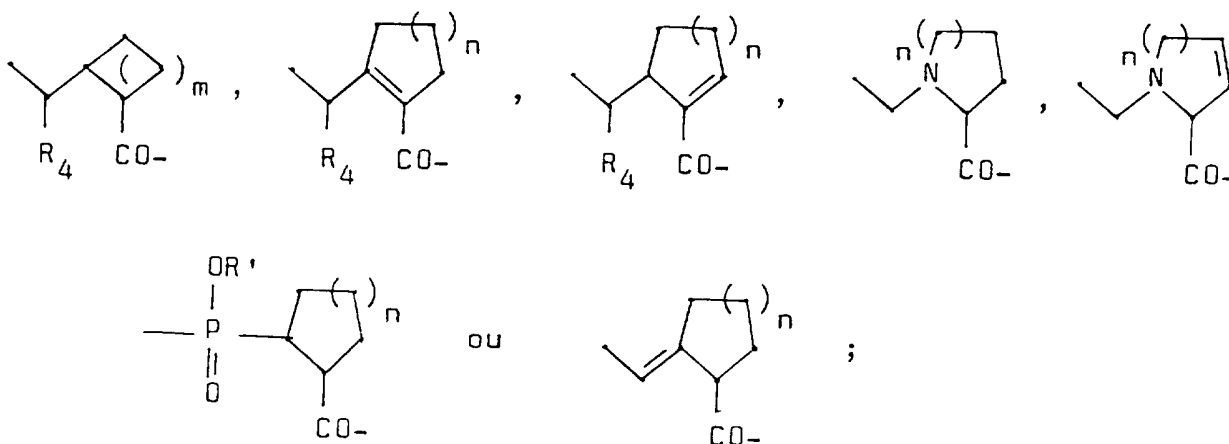
M é Cha, $\text{Phe}(4'\text{R}_a)$ ou $-\text{NHCHR}_1\text{R}_2-$;

em que:

R_1 é, independentemente, AlqC_{1-5} , $(\text{CH}_2)_n\text{SA1qC}_{1-5}$, $(\text{CH}_2)_n\text{OAlqC}_{1-5}$, $(\text{CH}_2)_n$ cicloalquilo C_{3-7} ou $(\text{CH}_2)_m\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}_a$;

R_a é halogéneo, OR' , NO_2 , NH_2 ou H;

R_2 é $(\text{CH}_2)_n-$, $\text{CHR}_3(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, $\text{CO}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, CHR_3CHR_3 , $(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, CHR_3CHR_3 , $\text{CHR}_1(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, $\text{CHR}_3\text{CHR}_1\text{CHR}'(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, $\text{CHR}_3\text{CHR}'\text{CHR}_1(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, $\text{COCHR}_1\text{CHR}'(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, $\text{COCF}_2\text{CR}'\text{R}''(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, $\text{COCF}_2(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, $\text{CH}=\text{CR}'\text{CHR}''(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, $\text{COCH}=\text{CR}'(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, $\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_p\text{CHR}'(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, $\text{CH}_2\text{NR}'\text{CHR}''(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, $\text{P}=\text{O}(\text{OR}')(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$,



R_3 e R_3 , são, cada um deles independentemente, OH, H ou NH_2 ;

R_4 é OH, H, NH_2 ou =O;

-10-

m é, independentemente, 0, 1, 2 ou 3;

n é, independentemente, 1 ou 2,

p é 0, 1 ou 2; e

R' é H ou AlqC₁₋₅;

R'' é H ou AlqC₁₋₁₈;

R''' é H, AlqC₁₋₅, cicloalquiloC₃₋₆, (CH₂)_nC₆H₅,
(CH₂)_nC₅H₄N, (CH₂)_nOH, (CH₂)_nNH₂, ou (CH₂)_nNHC(NH)NH₂;

e os seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

Também incluídos neste invento estão os processos para a preparação de sais de adição, complexos ou pródrogas farmacêuticamente aceitáveis dos compostos de acordo com este invento. As pródrogas são consideradas como sendo quaisquer veículos ligados covalentemente, os quais libertam, in vivo, a droga de acordo com a fórmula (I) original activa.

Porquanto possa diferir da notação convencional, deverá notar-se na fórmula (I) que A compreende o grupo terminal amino do péptido e Z compreende o grupo terminal carboxilo do péptido. Assim, quando A e Z são H, os resíduos terminais dos péptidos são, respectivamente, aminoácidos "des-amino" e "descarboxi".

Empregando esta representação, A compreende o grupo terminal amino do resíduo correspondente a B, ou, quando B é uma ligação covalente, a Q; ou, quando a é 0 e B é uma ligação covalente, a C; ou, quando B é uma ligação covalente e a e b são 0, a D. Quando B é uma ligação covalente e a, b, e c são 0, o grupo amino de M é substituído por um grupo acilo ou alquilo, como especialmente determinado por A na fórmula (I). De modo semelhante, Z compreende o grupo terminal carboxilo do resíduo de aminoácido correspondente a Y; ou, quando Y é uma ligação covalente, a X; ou, quando Y é uma ligação covalente e d e e são 0, o grupo terminal carboxilo de M é substituído por Z, como especialmente determinado na fórmula (I).

A operação dos subscritos a-c na fórmula (I) é para assinalar que os resíduos podem ser removidos do terminal amino do

-11-

péptido com retenção da utilidade nos compostos. Tal operação destina-se a prosseguir duma forma sequencial; de modo que a não é 0 excepto se Y é uma ligação covalente, b não é 0 excepto se a é 0, e c não é 0 onde b é 0. No terminal carboxi, e não é 0 excepto se Y é uma ligação covalente. Tal como mais completamente descrito daqui em diante, d opera independentemente e é 1 quando M é Cha ou Phe(R_a), e quer 1 quer 0, preferivelmente 0, quando M é $-NHCHR_1R_2$.

Outras abreviaturas e símbolos, comumente utilizados na especialidade, são aqui utilizados para descrever os péptidos.

Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra
Alanina	Ala	A	Leucina	Leu	L
Arginina	Arg	R	Lisina	Lys	K
Asparagina	Asn	N	Metionina	Met	M
Ácido aspártico	Asp	D	Fenilalanina	Phe	F
Cisteína	Cys	C	Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q	Serina	Ser	S
Ácido glutâmico	Glu	E	Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	G	Triptofano	Trp	W
Histidina	His	H	Tirosina	Tyr	Y
Isoleucina	Ile	I	Valina	Val	V
Asparagina ou Ácido Aspártico				Asx	B
Glutamina ou Ácido Glutâmico				Glx	Z

De acordo com a representação convencional, o terminal amino está à esquerda e o terminal carboxi está à direita. A não ser se especificado doutro modo, presume-se que todos os aminoácidos quirais (AA) são da configuração absoluta L. ($4'R_a$)Phe refere-se a fenilalanina substituída, na posição 4 do anel fenilo, por R_a . Seria apreciado que, quando R_a é hidrogénio, o resíduo constitui fenilalanina e quando R_a é OH, o resíduo constitui tiro-sina. β -Ala refere-se ao ácido 3-amino propanóico. Cha refere-se à ciclo-hexilalanina. Boc refere-se ao radical t-butiloxica

-12-

bonil, Dns refere-se ao radical dansilo que é 1-dimetilamino naftileno-5-sulfonilo, Cbz refere-se ao radical carbobenziloxi, BrZ refere-se ao radical O-bromobenziloxycarbonil, Clz é o radical p-clorocarbobenziloxi, Cl₂Z refere-se ao radical 2,4-diclorocarbobenziloxi, Bzl refere-se ao radical benzilo, MeBzl refere-se ao radical 4-metilbenzilo, Ac refere-se a acetilo, Alq ou AlqC₁₋₅ refere-se ao alquilo C₁₋₅, Ph refere-se ao fenilo, DCC refere-se à diciclo-hexilcarbodiimida, DMAP refere-se à dimetilaminopiridina, HOBT refere-se ao 1-hidroxibenzotriazol, NMM é N-metilmorfolina, DTT é ditiotreitol, EDTA é ácido etilenodiamina, tetracético, DIEA é diisopropil etilamina, DBU é 1,8-diazobiciclo[5.4.0]undec-7-eno, DMSO é dimetilsulfóxido, DMF é dimetilformamida e THF é tetra-hidrofurano. HF refere-se ao ácido fluorídrico e TFA refere-se ao ácido trifluoroacético. Alquil C₁₋₅, tal como aqui aplicado, destina-se a incluir metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, butilo terciário, pentilo e isopentilo. Tal como aqui utilizados nos compostos de acordo com este invento, Asp e Glu, os quais têm cadeias laterais de ácidos carboxílico, abrangem ácidos carboxílicos livres, alquilo C₁₋₅ e cadeias laterais de éster de benzilo. AlqC₁₋₈ destina-se a incluir qualquer grupo alquilo de cadeia linear ou ramificada de 1 a 18 carbonos.

Os péptidos de acordo com este invento ligam-se às proteases virais de uma forma que imita a ligação ao substrato natural. Os péptidos são, na generalidade, dodecapéptidos ou menores. Contudo, péptidos mais longos, que englobam os resíduos aqui definidos como -Q-C-D-M-W-X, como fornecido na fórmula (I), também se acredita serem activos e são considerados dentro do âmbito deste invento. Os resíduos mais próximos do sítio de clivagem suposto do péptido, designado como M-W, são os mais importantes para ligação, X é, preferivelmente, um aminoácido neutro ou ácido. Adequadamente, X é Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Met, Lys, Glx ou Asx. A valina é especialmente adequada. D é, preferivelmente, um aminoácido neutro ou hidrofóbico, apesar de certos resíduos hidrofílicos, tais como Asp e Ser, serem aceitáveis. Gln, Asn, Ala, β-Ala, Ile, Leu, Val e Met são preferidos. Gln, Asn

-13-

e Ala são especialmente preferidos. O resíduo correspondente a C pode ser um aminoácido neutro, ácido ou básico. Glu, Gln, Arg, Lys, Ser, Ala, β -Ala, Asn e Gly são adequados. Gln, Asn e Ala são especialmente preferidos para C. O resíduo Q é, preferivelmente, um resíduo hidrofílico, tal como Ser, Thr, Asp ou His, D ou L. Especialmente preferidos são Thr e Ser.

B corresponde a um ou mais aminoácidos, os quais podem ser hidrofílicos ou hidrofóbicos, ou pode ser, nos péptidos mais curtos, uma ligação covalente. A identidade de B não é crítica e um resíduo pode ser escolhido pelas propriedades físico-químicas e bioquímicas que confere ao péptido global, tais como solubilidade na água e resistência às exopeptidases. A escolha de um aminoácido D confere, muitas vezes, resistência às exopeptidases quando o aminoácido D se encontra no terminal do péptido. Quando B é uma ligação covalente, poderá ser vantajoso para Q ser um aminoácido D. Quando B não é uma ligação covalente, B é, preferivelmente, um ou dois aminoácidos D ou L escolhidos a partir de Ala, β -Ala, Gly, Ile, Val, Leu, Met, His, Lys, Arg, Glx, Asx, Cys, Ser ou Thr. Para a produção dos péptidos mais pequenos de acordo com este invento, os quais se ligam à protease retroviral, B é preferivelmente uma ligação covalente.

Y pode corresponder a um ou mais aminoácidos, ou a uma ligação covalente. Se é um ou mais aminoácidos, estes podem ser hidrofílicos ou hidrofóbicos. São preferidos um a três resíduos, mas uma cadeia mais longa é aceitável. De forma muito semelhante à de B, os resíduos de Y podem ser utilizados para conferir propriedades físico-químicas e bioquímicas favoráveis ao péptido. Desse modo, o uso de resíduos hidrofílicos poderá ser utilizado para conferir propriedades de solubilidade desejáveis ou aminoácido D no terminal carboxi poderão ser utilizados para conferir resistência às exopeptidases. Preferivelmente, Y é um a três aminoácidos escolhidos a partir de Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Val, Arg, Lys, Thr, Ser, Cys, Glx ou Asx. Para os péptidos mais curtos de acordo com este invento, Y pode ser uma ligação covalente, mas um aminoácido único é especialmente apropriado. Ala, Gly, Ile, Met, Arg, Asx e Val são preferidos. A valina é especialmen

-14-

te preferida.

Os péptidos em que M é Cha ou Phe(4'Ra) e d é l podem actuar como substratos e são hidrolisados em péptidos menores. Apesar dos substratos poderem ser, na generalidade, de qualquer comprimento, são preferidos 6-9 resíduos. Estes são convenientemente utilizados para analisar a actividade da protease. Além disso, podem competir com is substratos virais naturais e, assim, servir para inibir a replicação viral e, portanto, a progressão da doença in vivo; se bem que, dada a sua instabilidade metabólica, a sua duração de acção poderia ser curta. Tipicamente, es tes péptidos podem ser utilizados na análise da actividade da protease submetendo o péptido à protease num meio tamponado adequado. A análise da actividade é efectuada de modo a detectar a clivagem do péptido. Tal método estabelece a separação de, pelo menos, um dos produtos do péptido ou um dos seus derivados, e a sua quantificação.

Numa tal análise, os recursos cromatográficos podem ser utilizados para efectuar a separação dos produtos do péptido usando suportes sólidos convencionais, tais como gel de sílica, octa decilsilano, Sephadex[®], resinas permutadoras de iões ou resinas de adsorção. A detecção/quantificação dos produtos é efectuada por absorção de ultravioletas ou outras análises espectroscópicas. Alternativamente, a incorporação ou substituição de um isótopo radioactivo no péptido, tal como trítio ou ¹³C em um ou mais dos aminoácidos, fornece uma detecção/quantificação baseada na radioactividade. Noutra alternativa, a incorporação de uma porção fluorescente, tal como um grupo dansilo no terminal amino do péptido, fornece uma detecção/quantificação por fluorescência. Os métodos fluorogénicos, os quais incorporariam um agente de extinção no péptido, tal como um oxi-éster de 3-(4-N-metil-piridil)-propilo do terminal carboxi, além do marcador fluorescente, também seriam úteis para testar a actividade da protease. Tais métodos são descritos, por exemplo, por Dunn e colab., Anal. Biochem., 129, 502 (1983), e fornecem a monitorização contínua da actividade. Estes métodos fluorogénicos têm vantagens dado que a hidrólise é directamente observada sem a necessidade da separa

ção dos produtos da hidrólise.

A actividade de ligação da protease dos péptidos de acordo com este invento, em que M é Cha ou (4'Ra)Phe, é demonstrada pela sua capacidade para actuarem como substratos. A tabela seguinte ilustra as cinéticas do substrato destes péptidos.

Tabela I

Cinéticas de Substrato de péptidos de ligação à protease do rHIV

<u>Composto do</u> <u>Exemplo No.</u>	<u>Rel.</u> <u>V_o</u>	<u>K_M</u> <u>(mM)</u>	<u>K_{cat}</u> <u>(min⁻¹)</u>
1	1,0	6,7	42
39	1,0	6,9	41
40	0,35	8,6	16
41	ins.*	-	-
42	1,34	1,9	21
43	0,48	20	30
44	0,48	2,2	5
45	0,46	11	21
46	1,23	2,3	12
47	0,36	8	15
48	1,0	6,8	35
49	0,65	6,0	18,4
50	0,32	5,0	1,8
51	ins.*	-	-
52	ins.*	-	-
53	0,71	1,6	12
54	0,39	0,71	2,03
55	0,86	6,5	23,0
56	1,45	1,2	31
57	ins.*	-	-
59	0,56	3,3	8,0
60	0,54	8,0	18
61	0,51	2,3	6,4
62	0,05	-	-
63	0,045	4,9	1,8

-16-

Tabela I

Cinéticas de substrato de péptidos de ligação à protease do rHIV

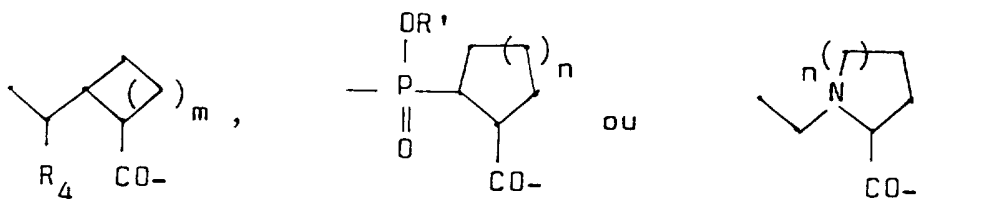
<u>Composto do</u> <u>Exemplo Nº.</u>	<u>Rel.</u> <u>V_o</u>	<u>K_M</u> <u>(mM)</u>	<u>K_{cat}</u> <u>(min⁻¹)</u>
64	1,24	-	-
65	0,11	19	14
66	1,25	11,7	183
67	0,07	-	-
68	0,98	-	-
69	0,70	-	-
70	0,56	-	-
95	ins.*	12,8	5,3
96	0,34	17,7	90,4
98	0,16	25	65
99	0,09	6,2	1,4
100	0,045	1,8	0,38
101	0,06	6,2	7,8
102	1,27	7,7	96
105	1,09	-	-
107	0,24	-	-
108	ins.*	-	-
109	1,24	-	-
110	1,29	9,8	103
111	1,33	34	374
112	ins.*	-	-
113	ins.*	-	-
115	0,48	7,1	16
118	ins.*	-	-
119	ins.*	30	-
121	0,80	0,96	16,6

* insignificante

- não efectuado

Noutro aspecto, estes péptidos substrato, nos quais M é Cha ou (4'Ra)Phe, são também indicadores úteis para a descoberta de sequências de aminoácidos que se ligam às proteases virais e, portanto, inibem a actividade proteolítica. As modificações de tais péptidos que se ligam às proteases virais de modo a retardar a hidrólise do péptido fornecem um meio de produzir inibição de maior duração da actividade da protease.

Consequentemente, um outro grupo subgenérico de compostos de acordo com este invento compreende os péptidos em que o resíduo M é $-NHCHR_1R_2-$. Estes péptidos contêm um aminoácido não natural, o qual não é um aminoácido α . Estes péptidos não possuem uma ligação peptídica do mesmo modo que um substrato e, portanto, apesar de eles se ligarem à protease de uma forma que mimetiza a ligação ao substrato natural, são resistentes à hidrólise. Os péptidos de 2-9 resíduos são adequados. Os péptidos de 3-6 resíduos são preferidos. Preferivelmente, quando M é $-NHCHR_1R_2-$, d=0 e W está ausente, desde que o aminoácido não natural possa actuar como um mimico dipéptidico. Numa concretização preferida, R_1 é $CH_2C_6H_4-R_a$, $CH_2C_6H_{11}$ ou $AlqC_{1-5}$. R_2 é preferivelmente CHR_3CHR_3 , $(CH_2)_mCO-$, $CHR_3CHR_3CHR_1CO-$, $CHR_3CHR_1CHR'CO-$, $CHR_3(CH_2)_mCO-$, $CO(CH_2)_mCO-$, $COCHR_1CHR'(CH_2)_mCO-$, $CHR_3CF_2(CH_2)_mCO-$, $COCF_2(CH_2)_mCO-$, $-P=O(OR')(CH_2)_mCO-$,



em que R' , R_3 , R_3 , m e n têm os significados definidos na fórmula (I). Nas concretizações preferidas, R_1 é $CH_2C_6H_4-R_a$ e R_2 é $CH(OH)CH_2CH_2CO-$.

Quando administrado a um animal infectado ou potencialmente infectado com um vírus, o qual é dependente de uma protease codificada pelo vírus para processamento de poliproteínas virais, a replicação viral é inibida e, consequentemente, a progressão da doença é retardada. Visto que parecem existir sequências consen-

suais para os substratos poliproteicos de vários retrovírus, um inibidor ou substrato será provavelmente largamente activo sobre uma série de retrovírus. Os vírus de ADN, os quais são dependentes de proteases codificadas pelo vírus, tal com o vírus da hepatite, podem ser também sensíveis ao referido tratamento.

Os compostos seguintes estão incluídos em, mas de forma alguma limitam, o âmbito deste invento:

2-(acetil-serilglutaminilasparaginil)amino-3-fenilpropil-prolilvalil valinamida;

2-(serilglutaminilasparaginil)amino-3-fenilpropilprolilvalil valinamida;

2-(acetil-serilglutaminilasparaginil)amino-3-hidroxi-1--oxo-5-fenilpentilprolilvalil valinamida;

2-(acetil-serilglutaminilasparaginil)amino-3-hidroxi-1--oxo-5-fenilpentilvalil valinamida;

2-(seril-glutaminilasparaginil)amino-3(S)-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentilvalil valinamida;

éster de metilo de 2-((2-(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino-1-oxo-3-fenilpropil)ciclopentilcarbonilvalil valina;

éster de metilo de 2-(2-(serilalanilalanil)amino-1-oxo-3-fenilpropil)ciclopentil-carbonilvalilvalina, sal de ácido acético trifluoroacético;

éster de metilo de 2-(2-(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenilpropil)ciclopentilcarbonilvalil valina;

éster de metilo de 2-(-1-hidroxi-3-fenil-2-(serilalanilalanil)aminopropil)ciclopentilcarbonilvalilvalina, sal de ácido trifluoroacético;

éster de metilo de 2-((1-metoxi-1-(2-fenil-1-(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino)etil)fosfinil)ciclopentilcarbonilvalilvalina;

-19-

éster de metilo de 2-((1-hidroxi-1-(2-fenil-1-(serilalanil)amino)etil)fosfinil)ciclopentilcarbonilvalil valina;

éster de metilo de 5-(terc-butoxicarbonil-serilalanil-alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexilvalil valina;

éster de metilo de 5-(terc-butoxicarbonil-serilalanil-alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)hexilvalil valina;

éster de metilo de 4-(terc-butoxicarbonil-serilalanil-alanil)amino-2,2-difluoro-3-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentilvalil valina cloridrato;

éster de metilo de 4-(serilalanilalanil)amino-2,2-difluoro-3-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentilvalil valina cloridrato;

éster de metilo de 4-(serilalanilalanil)amino-2,2-difluoro-1,3-dioxo-5-fenilpentilvalil valina cloridrato;

5-(t-butiloxycarbonilserilalanilalanil)amino-4-hidroxi-6-(4-hidroxi)fenil-1-oxo-hexilvalil amida;

éster de metilo de 5-((carbobenziloxi-D-seril)alanil-alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexilvalil valina;

éster de metilo de 5-((D-seril)alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina;

5-(t-butiloxycarbonilserilalanilalanil)amino-6-(4-hidroxi)fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexilvalil valina;

5-(serilalanilalanil)amino-6-(4-hidroxi)fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexilvalil valina cloridrato;

éster de metilo de 2-((1-hidroxi-2-(serilalanilalanil)-amino-3-ciclo-hexil)propil)ciclopentanocarbonilvalil valina cloridrato;

2-((2-(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino-1-oxo-3-fenilpropil)ciclopentilcarbonilvalil valinamida;

2-(2-(serilalanilalanil)amino-1-oxo-3-fenilpropil)ciclopentilcarbonilvalilvalinamida, sal de ácido acético trifluoroacético;

-20-

2-(2-(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenilpropil)ciclopentilcarbonilvalil valinamida;

2-(-1-hidroxi-3-fenil-2-(serilalanilalanil)aminopropil)-ciclopentilcarbonilvalilvalinamida, sal de ácido acético trifluoroacético;

2-((1-metoxi-1-(2-fenil-1-(terc-butiloxycarbonil-serilalanilalanil)amino)etil)fosfinil)ciclopentilcarbonilvalilvalinamida;

2-((1-hidroxi-1-(2-fenil-1-(serilalanilalanil)amino)-etil)fosfinil)ciclopentilcarbonil-valil valinamida;

5-(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valinamida;

5-(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxi-fenil)hexil-valil valinamida;

4-(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino-2,2-difluoro-3-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentil-valil valinamida, cloridrato;

4-(serilalanilalanil)amino-2,2-difluoro-3-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentilvalil valinamida, cloridrato;

4-(serilalanilalanil)amino-2,2-difluoro-1,3-dioxo-5-fenilpentil-valil valinamida, cloridrato;

5-((carbobenziloxi-D-seril)alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valinamida;

5-((D-seril)alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valinamida;

5-(t-butiloxycarbonilserilalanilalanil)amino-6-(4-hidroxi)fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valinamida;

5-(serilalanilalanil)amino-6-(4-hidroxi)fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valinamida, cloridrato;

2-((1-hidroxi-2-(serilalanilalanil)amino-3-ciclo-hexil)-propil)ciclopentanocarbonilvalil valinamida, cloridrato;

éster de metilo de (4S,5S)-5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)hexil-valil valina, sal de ácido acético;

-21-

éster de metilo de (4S,5S)-5-((carbобензилокси- β -alanil)alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxi-fenil)hexilvalil valina;

éster de metilo de (4S,5S)-5-((β -alanil)alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxi-fenil)hexilvalil valina, cloridrato;

éster de metilo de (4S,5S)-5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-ciclo-hexil-hexil-valil valina;

éster de metilo de (4S,5S)-5-(carbобензилокси-alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina;

éster de metilo de (4S,5S)-5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina;

(4S,5S)-5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxi-fenil)hexil-valil valinamida, sal de ácido acético;

(4S,5S)-5-((carbобензилокси- β -alanil)alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxi-fenil)hexilvalil valinamida;

(4S,5S)-5-((β -alanil)alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxi-fenil)hexilvalil valinamida, cloridrato;

(4S,5S)-5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-ciclo-hexil-hexil-valil valinamida;

(4S,5S)-5-(carbобензилокси-alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valinamida;

(4S,5S)-5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valinamida;

éster de metilo de (4S,5S)-5-(carbобензилокси-alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexilvalil valina;

(4S,5S)-5-(alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina, sal de ácido acético;

éster de metilo de (4S,5S)-5-(terc-butiloxicarbonilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxi-fenil)hexil-valil valina;

éster de metilo de (4S,5S)-5-alanilamino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxi-fenil)-hexil-valil valina, sal de ácido acético;

-22-

(4S,5S)-5-(carbобензилоксиаланил)амино-4-гидрокси-1-оксо-6-фенил-гексил-валил валинамида;

(4S,5S)-5-(аланил)амино-4-гидрокси-1-оксо-6-фенил-гексил-валил валинамида;

(4S,5S)-5-(терц-бутилоксикарбонилаланил)амино-4-гидрокси-1-оксо-6-(4-гидроксифенил)гексилвалил валинамида;

(4S,5S)-5-(аланил)амино-4-гидрокси-1-оксо-6-(4-гидроксифенил)-гексил-валил валинамида, сал де а́cido acético;

э́стер де бензи́ло де (4R,5S)-5-амино-6-(4-гидрокси)фенил-4-гидрокси-1-оксо-гексил-валил вали́на, хлори́драто;

э́стер де мети́ло де (1R,2R)-2-(((1S,2S)-1-гидрокси-2-амино-3-цикло-гексил)пропил)-циклопентаноксикарбонил-валил вали́на, хлори́драто;

э́стер де мети́ло де (4S,5S)-5-амино-4-гидрокси-1-оксо-6-фенил-гексил-валил вали́на, хлори́драто;

э́стер де мети́ло де (4S,5S)-5-(терц-бутилоксикарбонил)амино-4-гидрокси-1-оксо-6-фенил-гексил-валил вали́на;

(4R,5S)-5-амино-6-(4-гидрокси)фенил-4-гидрокси-1-оксо-гексил-валил валинамида, хлори́драто;

(1R,2R)-2-(((1S,2S)-1-гидрокси-2-амино-3-цикло-гексил)пропил)-циклопентаноксикарбонил-валил валинамида, хлори́драто;

(4S,5S)-5-амино-4-гидрокси-1-оксо-6-фенил-гексил-валил вали́на, хлори́драто;

(4S,5S)-5-(терц-бутилоксикарбонил)амино-4-гидрокси-1-оксо-6-фенил-гексил-валил валинамида;

(5S)-5-(carbобензилоксиаланил)амино-4-гидрокси-1-оксо-6-фенил-гексил-вали́на, исобути́л ами́да;

(5S)-5-(миристи́л)амино-4-гидрокси-1-оксо-6-фенил-гексил вали́на, исобути́л ами́да;

(5S)-5-(carbобензилоксиаланилаланил)амино-4-гидрокси-1-оксо-6-фенил-гексил вали́на, исобути́лами́да;

-23-

(5S)-5-(estearil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil valina, isobutil amida;

éster de metilo de 5-(carbобензилоксиаланил)amino-4-hidroxi-2-metil-1-oxo-6-fenil-hexilvalil valina;

7-metil-5-(carbобензилоксиаланил)amino-3,4-di-hidroxi-2-fenil-1-oxo-octil valina, isobutilamida;

5-(carbобензилоксиаланилаланил)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil valina, isobutil amida;

5-(carbобензилокси-аланилаланил)amino-6-fenil-4-hidroxi-(1-oxo)hexil-valil valinol;

carbобензилокси-аланил-(3-hidroxi-5-amino-6-fenil)hexanoil-valil-(4-aminometil)piridina;

5-(carbобензилоксиаланилаланил)amino-4-hidroxi-6-fenil-(1-oxo)hexil-valina isobutilamida;

(4S,5S)-5-(metoxicarbonil-аланилаланил)amino-6-fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina;

(4S,5S)-5-(carbобензилокси-аланилаланил)amino-6-fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina;

(4S,5S)-5-(аланилаланил)amino-6-fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina;

éster de metilo de ácido (4RS,5S)-5-((terc-butiloxicarbonil)isoleucil)amino-7-metil-4-hidroxi-1-oxo-octil-leucil-(O-benzil)aspártico; e

éster de metilo de ácido (4RS,5S)-5-((terc-butiloxicarbonil)isoleucil)amino-7-metil-4-hidroxi-1-oxo-octil-leucil-aspártico.

Alguns compostos individuais preferidos são:

éster de metilo de (4S,5S)-5-(carbобензилокси-аланилаланил)amino-6-fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina;

éster de metilo de (4S,5S)-5-(аланилаланил)amino-6-fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina;

éster de metilo de (4S,5S)-5-(carbобензилокси-аланил)-

-24-

amino-6-fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina;

éster de metilo de (4S,5S)-5-(alanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexilvalil valina; e

éster de metilo de ácido (4RS,5S)-5-((terc-butiloxicarbonil)isoleucil)amino-7-metil-4-hidroxi-1-oxo-octil-leucil-(O-benzil)aspártico; e os seus ácidos carboxílicos e carboxamidas.

Os péptidos de acordo com este invento são preparados por acoplamento dos resíduos de aminoácido apropriados, facultativamente removendo-se quaisquer grupos protectores e facultativamente modificando os terminais amino ou carboxi do péptido. São preparados, preferivelmente, pela técnica de fase sólida de Merrifield (J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1964)), apesar de métodos em solução conhecidos na especialidade poderem ser empregues com sucesso. Métodos em solução ou uma combinação dos métodos de fase sólida e de solução, podem ser utilizados numa síntese convergente, na qual os fragmentos di-, tri-, tetra-, ou pentapeptídicos são preparados por síntese de fase sólida ou de solução e quer ligados a outros di-, tri- ou tetrapéptidos, quer adicionalmente modificados por síntese de solução. Os métodos de síntese de péptidos descritos, na generalidade, em J. M. Stewart e J. D. Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", Pierce Chemical Company, Rockford, Il (1984) ou M. Bodonsky, Y. A. Klauser e M. A. Ondetti, "Peptide Synthesis", John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y. (1976) podem ser utilizados para produzir os péptidos de acordo com este invento e são aqui incorporados por referência.

Cada aminoácido ou péptido é adequadamente protegido, tal como conhecido na especialidade relacionada com os péptidos. Por exemplo, o grupo Boc ou carbobenziloxi é preferido para protecção do grupo amino, especialmente na posição α . Um grupo benzilo ou, adequadamente, um grupo benzilo substituído, é utilizado para proteger o grupo mercapto da cisteína ou outros aminoácidos contendo tiol; ou o hidroxilo de serina ou da treonina. O grupo tosilo ou o azoto pode ser utilizado para protecção da guanidina da Arg ou o imidazol da His, e um grupo carbobenziloxi ou benzilo adequadamente substituído pode ser utilizado para o grupo hidroxilo da Tyr, Ser ou Thr, ou para o grupo ϵ -amino da lisina. A subs

-25-

tituição adequada dos grupos protectores carbobenziloxi ou benzil é uma substituição orto e/ou para com cloro, bromo, azoto ou metilo e é utilizada para modificar a reactividade do grupo protector. A cisteína e outros aminoácidos contendo enxofre podem ser também protegidos pela formação de um dissulfeto com um grupo tioalquilo ou tioarilo. Excepto para o grupo Boc, os grupos protectores são, o mais convenientemente, aqueles que não são removidos por tratamento ácido suave. Estes grupos protectores são removidos por mé todos tais como hidrogenação catalítica, sódio em amónia líquida ou tratamento de HF, como conhecidos na especialidade.

Se são utilizados métodos de fase sólida, o péptido é construído sequencialmente a partir do terminal carboxi e trabalhando em direcção do terminal amino do péptido. A síntese de fa se sólida inicia-se pela ligação covalente do terminal C de um aminoácido protegido a uma resina adequada, tal como uma resina de benz-hidrilamina (BHA), resina de metilbenz-hidrilamina (MBHA) ou resina de clorometilo (CMR), tal como descritas na generalidade na Patente dos E.U.A. Nº. 4 244 946. Uma resina de suporte BHA ou MBHA é utilizada se o terminal carboxi do péptido produto é uma carboxamida. É geralmente utilizado um suporte de CMR se o terminal carboxi do péptido produto é um grupo carboxil, embora esta também possa ser utilizada para produzir uma carboxamida ou um éster.

Uma vez que o primeiro aminoácido (AA) protegido tenha sido ligado à resina desejada, o grupo amino é hidrolisado por tratamento ácido suave e o carboxilo livre do segundo AA protegido é acoplado a este grupo amino. Este processo é executado sequencialmente, sem isolamento do intermediário, até que o péptido desejado se tenha formado. O péptido completo pode então ser des bloqueado e/ou separado da resina portadora, em qualquer ordem.

O tratamento de um péptido suportado pela CMR com HF ou HBr/ácido acético separa o péptido da resina e produz o aminoácido do terminal carboxi como um ácido carboxílico. O tratamento de um péptido suportado pela CMR com amónia ou alquilaminas num solvente alcoólico fornece uma carboxamida ou uma alquilcarboxami da no terminal carboxi.

-26-

Se é desejado um éster, a resina CMR pode ser tratada com um álcool apropriado, tal como álcool metílico, etílico, propílico, butílico ou benzílico, em presença de trietilamina, para clivar o péptido da resina e produzir o éster directamente.

Ésteres dos péptidos de acordo com este invento podem também ser preparados, por métodos convencionais, a partir do precursor do ácido carboxílico. Tipicamente, o ácido carboxílico é tratado com um álcool em presença de um catalisador ácido. Alternativamente, o ácido carboxílico pode ser convertido num intermediário acilo activado, tal como um haleto ácido ou um éster ou anidrido activado e tratado com um álcool, preferivelmente em presença de uma base.

O método preferido para a clivagem de um péptido da resina de suporte é pelo tratamento do péptido suportado pela resina com HF anidro em presença de um depurador de catiões adequado, tal como anisol ou dimetoxi benzeno. Este método, simultaneamente, remove todos os grupos protectores, o grupo tioalquilo protector do enxofre, e separa o péptido da resina. Os péptidos hidrolisados deste modo da CMR são ácidos carboxílicos, e aqueles separados da resina BHA são obtidos como carboxamidas.

A modificação do grupo amino terminal do péptido é efectuada por alquilação ou acetilação, tal como é geralmente conhecido na especialidade. Estas modificações podem ser realizadas no aminoácido antes da incorporação no péptido, ou no péptido após este ter sido sintetizado e o grupo terminal amino libertado, mas antes dos grupos protectores terem sido removidos.

Tipicamente, a acetilação é realizada no aminoácido livre utilizando o haleto de acilo anidrido ou éster activado, do ácido de alquilo correspondente, em presença de uma amina terciária. A mono-alquilação é levada a cabo, o mais convenientemente, por alquilação redutora do grupo amino com um aldeído alifático ou cetona apropriados em presença de um agente redutor suave, tal como cianoboro-hidreto de lítio ou de sódio. A di-alquilação pode ser efectuada por tratamento do grupo amino com um excesso de um haleto de alquilo em presença de uma base. Crê-se que os gru-

-27-

pos alquilo e acilo de cadeia mais longa de acordo com este invento tenham propriedades vantajosas dada a sua afinidade para as membranas lipídicas. A miristilação e a estearilação, por exemplo, são úteis.

A síntese em solução dos péptidos é executada utilizando os métodos convencionais usados para formar ligações amida. Tipicamente, um aminoácido protegido com Boc, o qual tem um grupo carboxilo livre, é acoplado a um aminoácido protegido, o qual tem um grupo amino livre, utilizando um agente de acoplamento de carbodiimida adequado, tal como a N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC), facultativamente em presença de um catalisador tal como 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) e dimetilaminopiridina (DMAP). Outros métodos, tal como a formação de haletos de ácido, anidridos ou ésteres activados, do carboxilo livre de um aminoácido protegido com Boc, e posterior reacção com a amina livre de um aminoácido protegido, facultativamente em presença de uma base, são também adequados. Por exemplo, um aminoácido ou péptido protegido com Boc é tratado num solvente anidro, tal como cloreto de metileno ou tetra-hidrofurano (THF), em presença de uma base, tal como N-metilmorfolina, DMAP ou uma trialkilamina, com cloroformato de isobutilo para formar o "anidrido activado", o qual, subsequentemente, reage com a amina livre de um segundo aminoácido ou péptido protegido. O péptido formado por estes métodos pode ser selectivamente desprotegido, usando técnicas convencionais no terminal amino ou carboxi, e ser acoplado a outros péptidos ou aminoácidos utilizando técnicas semelhantes. Após o péptido ter sido completado, os grupos protectores podem ser removidos, como aqui anteriormente descrito, tal como por hidrogenação em presença de um catalisador de paládio ou platina, tratamento com sódio em amoníaco líquido, ácido fluorídrico ou álcali.

Os ésteres são, muitas vezes, utilizados para proteger o grupo terminal carboxil de péptidos na síntese de solução. Podem ser convertidos em ácidos carboxílicos por tratamento com um hidróxido ou carbonato de metal alcalino, tal como o hidróxido de potássio ou o carbonato de sódio, numa solução alcoólica aquosa. Os ácidos podem ser convertidos nos outros ésteres por meio de um

-28-

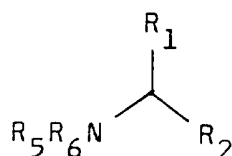
intermediário acilo activado como anteriormente descrito.

As amidas e as amidas substituídas de acordo com este invento são preparadas a partir dos ácidos carboxílicos dos pépti dos de modo muito semelhante. Assim, a amónia ou uma amina substituída pode reagir com um intermediário acilo activado para produzir a amida. O uso de reagentes de acoplamento, tal como DCC, é conveniente para a formação de amidas substituídas a partir do próprio ácido carboxílico e de uma amina adequada.

Além disso, os ésteres de metilo de acordo com este invento podem ser convertidos nas amidas, ou amidas substituídas, directamente por tratamento com amónia, ou uma amina substituída, numa solução de metanol. Uma solução de metanol do éster de meti lo do péptido é saturada com amónia e agitada num reactor pressu rizado para produzir a carboxamida simples dos péptidos. As car boxamidas são concretizações preferidas deste invento dada a sua estabilidade aumentada em relação aos ésteres.

O aminoácido que constitui o resíduo M do péptido com preende fenilalanina, um derivado da mesma ou um aminoácido não natural designado por $\text{-NHCHR}_1\text{R}_2\text{-}$. Os derivados da fenilalanina incluem tirosina, (O-alquilo C_{1-5}) tirosina, 4'-halofenilalanina, 4'-nitrofenilalanina e 4'-aminofenilalanina, como são geralmente bem conhecidos na especialidade relacionada com os péptidos.

Um intermediário útil na síntese de péptidos de acordo com este invento, em que M é $\text{-NHCHR}_1\text{R}_2\text{-}$, é representado pela fórmu la (IIa):



(IIa)

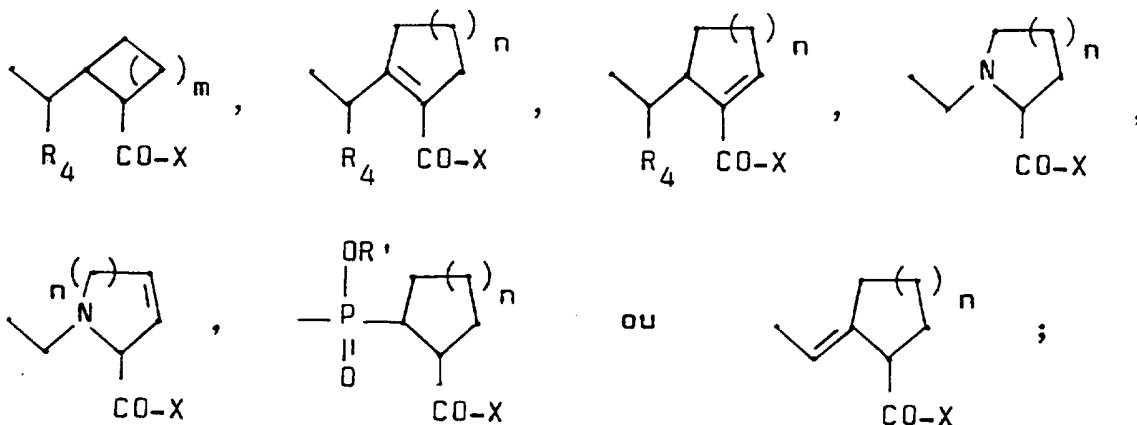
em que:

R_1 é, independentemente, AlqC_{1-5} , $(\text{CH}_2)_n\text{SA1qC}_{1-5}$, $(\text{CH}_2)_n\text{OA1qC}_{1-5}$, $(\text{CH}_2)_n$ cicloalquilo C_{3-7} ou $(\text{CH}_2)_m\text{C}_6\text{H}_4\text{-R}_a$;

R_a é halogéneo, OR' , NO_2 , NH_2 ou H;

-29-

R_2 é $(CH_2)_n-$, $CHR_3(CH_2)_mCO-$, $CO(CH_2)_mCO-$, $CHR_3CHR_3(CH_2)_m-$
 $CO-$, $CHR_3CHR_3CHR_1(CH_2)_mCO-$, $CHR_3CHR_1CHR'(CH_2)_mCO-$,
 $CHR_3CHR'CHR_1(CH_2)_mCO-$, $COCHR_1CHR'(CH_2)_mCO-$, $COCF_2CR'R''(CH_2)_mCO-$,
 $COCF_2(CH_2)_mCO-$, $CH=CR'CHR''(CH_2)_mCO-$, $COCH=CR'(CH_2)_mCO-$,
 $CH_2S(O)_pCHR'(CH_2)_mCO-$, $CH_2NR'CHR''(CH_2)_mCO-$, $P=O(OR')(CH_2)_mCO-$,



R_3 e R_3 , são, cada um deles independentemente, OH, H ou NH_2 ;

R_4 é OH, H, NH_2 ou =O;

m é, independentemente, 0, 1, 2 ou 3;

n é, independentemente, 1 ou 2;

p é, 0, 1 ou 2;

R_5 é H;

R_6 é CH_3CO , $AlqC_{1-5}$, Dns, Cbz ou Boc, ou, quando tomados em conjunto, R_5 e R_6 são ftalimido;

X é H, halogéneo, OR'' , $OAlqC_{1-5}$, $NHR'R''$ ou $OCOAlqC_{1-5}$;

R' é H ou $AlqC_{1-5}$; e

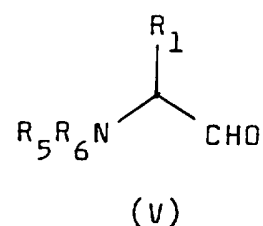
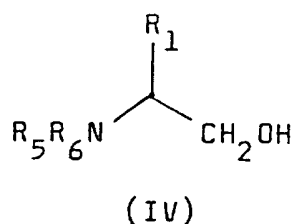
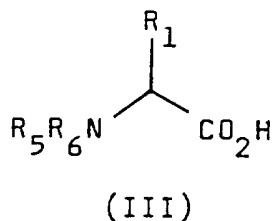
R'' é H ou $AlqC_{1-18}$.

Estes aminoácidos não naturais têm utilidade, neles mesmos, como intermediários que podem ser utilizados para preparar os inibidores da protease. Consequentemente, um substrato peptídico que se liga à protease pode ser convertido num inibidor por substituição de um ou ambos os aminoácidos no sítio cissil por um

-30-

composto de fórmula (IIa) adequado.

Os aminoácidos ~~não~~ naturais ^{não} são, geralmente, α -amino-ácidos, mas são derivados dos aminoácidos α . Assim, a identidade de R_1 é estabelecida pela escolha de um aminoácido de fórmula (III), em que R_1 é escolhido como anteriormente descrito.



A protecção do grupo amino do aminoácido α , por exemplo por um grupo Boc, acetilo ou ftaloil, e a conversão do ácido ou do éster num álcool de fórmula (IV) ou num aldeído de fórmula (V), fornece um intermediário versátil para a introdução do substituinte R_2 , e a preparação de compostos de acordo com este invento, os quais são designados pela fórmula (IIa). As N-metoxi-metil amidas destes aminoácidos α são intermediários úteis para este uso. Estes aminoácidos α podem ser obtidos a partir de fontes naturais, fontes comerciais ou podem ser sintetizados por um certo número de métodos bem conhecidos na especialidade relacionada com os péptidos.

Os álcoois de fórmula (IV) podem ser obtidos a partir da redução por diborano dos aminoácidos protegidos correspondentes. Os aldeídos de fórmula (V) podem ser obtidos a partir da redução do éster de metilo do aminoácido correspondente, por exemplo com hidreto de diisobutilalumínio (DIBAL). Alternativamente, o álcool de fórmula (IV) pode ser oxidado no aldeído utilizando um agente oxidante suave, tal como o periodinano de Dess-Martin ou utilizando o método de Swern (DMSO, cloreto de oxalilo, trietilamina).

Em exemplos, nos quais R_1 é Alq, os aminoácidos alanina, valina, leucina e isoleucina são especialmente úteis para a produção de aldeídos quirais. O ácido α -aminobutírico, o ácido α -aminoisobutírico e o ácido α -amino pentanóico estão comercialmente disponíveis como racematos. Em geral, qualquer ácido α -amino al

-31-

quilo pode ser sintetizado por alquilação de um éster do ácido nitroacético com um haleto de alquilo apropriado em presença de uma base, tal como a trietilamina, DBU ou outra amina terciária. Os alquóxidos tais como o metóxido ou o etóxido de sódio, são também bases adequadas. A redução subsequente do éster ou ácido α -nitro alquilo com hidrogénio e um catalisador de paládio ou platina produz o aminoácido. Alternativamente, é comum produzir os aminoáci dos α por alquilação de um éster de N-benzilidino glicina, tal como um éster de metilo ou etilo. Assim, o tratamento da benzili dina com uma base forte, tal como o hidreto de sódio ou potássio ou a diisopropilamida de lítio, seguida pela alquilação com um cloreto de alquilo apropriado, e a subsequente hidrólise ácida do grupo benzilideno, produz o aminoácido desejado. Estes métodos também são adaptáveis à formação de cicloalquil aminoácidos, por exemplo, pelo uso do brometo de cicloalquil metilo ou o brometo de 2-cicloalquil etilo. Outros métodos para a síntese de amino-ácidos quirais foram revelados por Evans e colab., Tet. Let., 1123 (1987).

A maior parte dos aminoácidos, nos quais R_1 é arilo ou aralquilo, estão disponíveis comercialmente, ou são bem conheci-dos na especialidade, tal como fenilalanina, 4'-halo e 4'-nitro-fenilalanina, tirosina, (O-alquil)tirosina, fenilglicina e (4'-hi droxi)fenilglicina. Homólogos destes compostos podem ser prepara dos por técnicas convencionais de síntese de aminoácidos. Assim, a alquilação de um éster de ácido nitroacético ou de N-benzilide-no glicina com 1-fenil-2-bromoetano ou 1-fenil-3-bromopropano, tal como descrita acima, produz os aminoácidos homólogos.

Os aminoácidos α nos quais R_1 contém oxigénio ou enxofre são obtidos a partir da serina, homo-serina, treonina, cisteína ou metionina ou da alquilação destes aminoácidos com excepção da metionina. A alquilação é efectuada por tratamento do composto hidroxilo ou tiol correspondente com uma base, tal como trietil-amina, DBU ou hidreto de sódio, e um haleto de alquilo apropriado, tal como o brometo de metilo, etilo, isopropilo ou isobutilo. Os di-homoanálogos são preparados por técnicas convencionais para a produção de aminoácidos tal como descritas acima. Consequentemen

-32-

te, um éster de ácido nitroacético é tratado com uma base, tal como anteriormente descrito, e acroleína, numa reacção de Michael. O aldeído produzido é subsequentemente reduzido por um agente reductor suave, tal como o boro-hidreto de sódio, para produzir o grupo hidroxí desejado. A redução catalítica subsequente do grupo nitro produz o ácido α -amino 5-hidroxí pentanóico. O análogo mercapto correspondente pode ser sintetizado a partir do intermediário hidroxí. Assim, após protecção dos grupos amino e carboxílico como conhecido na especialidade, o grupo hidroxilo é convertido num haleto, quer por tratamento com tribrometo de fósforo ou brometo ou cloreto de oxalilo em presença de trietilamina ou outra amina terciária, quer por tratamento com trifenilfosfina ou tetrabrometo de carbono. O tratamento do haleto com sulfeto de sódio ou tioacetato de potássio, seguido pela saponificação com hidróxido de sódio, produz o ácido 5-mercapto-2-amino pentanóico. Este intermediário pode ser adicionalmente alquilado da mesma forma, descrita acima, que a cisteína ou a serina.

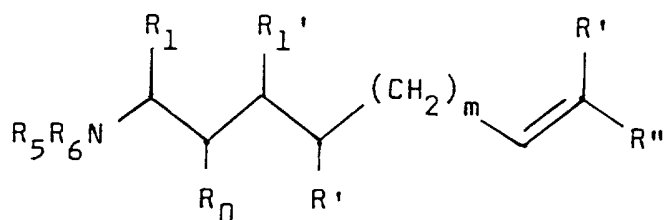
Tal como anteriormente indicado, os aminoácidos α aqui descritos podem ser convertidos em aldeídos e álcoois de fórmula (IV) e (V). A elaboração subsequente destes intermediários para introduzir o substituinte R_2 , e, portanto, formar os compostos de acordo com este invento designados na fórmula (IIa), é dependente da natureza de R_2 .

A introdução de um substituinte hidrocarboneto em R_2 é adequadamente efectuada por reacção do aldeído de fórmula (V) com um hidrocarboneto organometálico, tal como o reagente de Grignard ou espécie de organo-lítio. A funcionalidade do ácido carboxílico incipiente de R_2 está na forma protegida, como num éster orto, ou mascarada, como numa olefina oxidável. Numa concretização, a espécie organometálica é um alquileto de magnésio ou lítio gerado a partir de lítio ou magnésio e de um haleto de alquilenos, tal como o brometo de alilo, 1-bromo-3-butenos, 1-bromo-4-pentenos, ou 1-bromo-5-hexenos, ou um seu derivado substituído de alquilo.

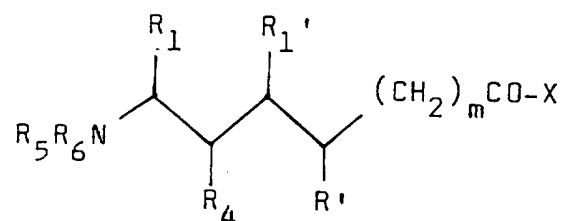
A adição do reagente organometálico a um aldeído de fórmula (IV) produz um hidroxialqueno de fórmula (VIIa) ou (VIIb), em que R_0 é OH, R_1' é H, $AlqC_{1-5}$, $(CH_2)_n OAlqC_{1-5}$, $(CH_2)_n$ cicloalquilo

-33-

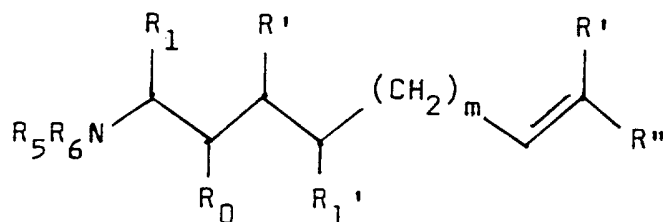
C_{3-7} ou $(CH_2)_m C_6H_4-R_a$, e $R_1, R_5, R_6, R', R'', m$ e n são tal como definidos para a fórmula (IIa).



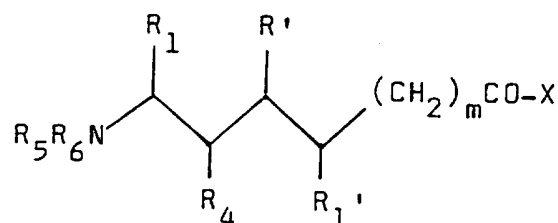
(VIa)



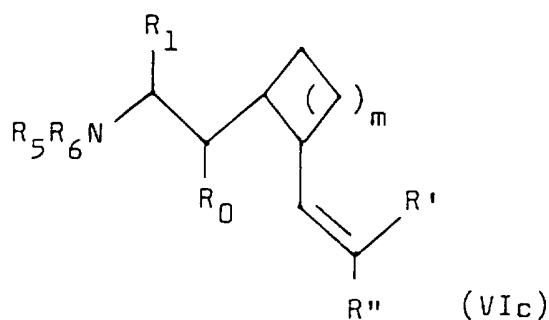
(VIIa)



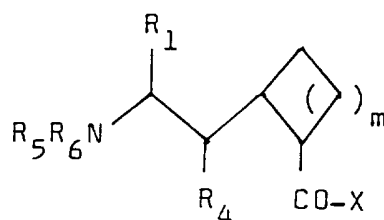
(VIb)



(VIIb)



(VIc)



(VIIc)

Alternativamente, a adição de um alquilideno organometálico, tal como um reagente de Grignard, à N-metoximetilamida de um aminoácido de fórmula (III), produz os ceto-alquenos de fórmula (VIa) e (VIb), em que R_0 é $=O$. Utilizando os mesmos processos, excepto a substituição por 1-metal-2-propenil ciclopentano ou 1-metal-2-propenil ciclo-hexano, são preparados os cicloalquil alquenos de fórmula (VIc) correspondentes, em que $R_1, R_5, R_6, R', R'', m$ e n são tal como definidos na fórmula (IIa). Consequentemente, um processo para a preparação de um composto de fórmula (VIIa), (VIIb) ou (VIIc), em que R_1' é H, $AlqC_{1-5}$, $(CH_2)_n OAlqC_{1-5}$, $(CH_2)_n$ cicloalquilo C_{3-7} ou $(CH_2)_m C_6H_4-R_a$, e $R_1, R_4, R_5, R_6, R', R'', X, m$ e n são tal como definidos na fórmula (IIa), compreende

a oxidação de um composto de fórmula (VIa), (VIb) ou (VIc) num ácido ceto-carboxílico (VIIa), (VIIb) ou (VIIc), em que R_4 é =O e X é OH, e, em seguida, em qualquer ordem, facultativamente reduzir ou aminar redutivamente o grupo ceto, e facultativamente converter o ácido carboxílico num éster, amida, aldeído, anidrido ou haleto de acilo. Adequadamente, R' é H e m é 0, e numa concretização preferida do composto (VIIa), R_1' é H.

A oxidação do hidroxil- ou ceto-alceno é efectuada por métodos convencionais, tais como ^{com}um permanganato de potássio ou por ozonólise seguida por exame padrão com sulfeto de dimetilo e oxidação subsequente com permanganato de potássio ou reagente de Jones. Como seria óbvio para um especialista na matéria, este método do não é aplicável quando R_1 contém um substituinte de enxofre. Outros métodos adaptáveis para preparar certos compostos deste tipo são descritos por Holladay e colab., J. Med. Chem., 30, 374-83 (1987) e Kempf, D., J. Org. Chem., 51, 21, 3921-26 (1986).

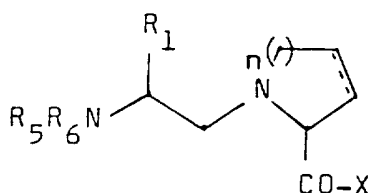
A redução dos compostos ceto de fórmula (VIIa), (VIIb) e (VIIc) (R_0 é =O) utilizando um agente redutor convencional, tal como o boro-hidreto de sódio, produz o álcool correspondente. Se o álcool é desejado, é muitas vezes útil protegê-lo pela formação quer de um éter benzílico ou silílico quer de um acetato, para prevenir reacções laterais não desejadas, tal como a lactonização e para melhorar a eficiência da incorporação posterior nos péptidos de acordo com este invento. Tal protecção do álcool é convencionalmente efectuada antes ou depois dos passos de oxidação conduzindo ao ácido carboxílico. O hidroxilo pode ser adicionalmente convertido no cloreto ou brometo utilizando um agente de halogenação, tal como o tricloreto de fósforo ou o tribrometo de fósforo e posteriormente reduzido num grupo metileno com hidrogénio e níquel Raney®. Se é desejado um grupo amino, o grupo ceto pode ser aminado redutivamente com cianoboro-hidreto de sódio e um haleto de amónio, tal como um cloreto ou brometo de amónio. O ácido carboxílico pode ser convertido num éster, amida, aldeído, anidrido ou haleto de acilo por métodos comuns bem conhecidos na especialidade química.

A introdução de insaturação em R_2 pode ser derivada dos

-35-

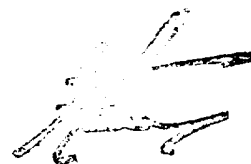
produtos de aminoácido correspondentes às fórmulas (VII). A redução do grupo carbonilo num grupo hidroxilo, como anteriormente indicado, fornece os compostos insaturados de acordo com este invento. O grupo hidroxilo pode ser eliminado por conversão num mesilato ou haleto, como anteriormente descrito, e tratamento com uma base, tal como DBU ou diisopropilamida de lítio. Outros métodos de eliminação do grupo hidroxilo, tal como o tratamento com ácido mineral suave (HCl , H_2SO_4), podem também ser adequados. Outros métodos para a introdução de insaturação em R_2 envolvem a olefinação de Wittig de um aldeído de fórmula (V). A redução destes compostos insaturados com hidrogénio e um catalisador de paládio fornece um método global alternativo para executar a remoção do grupo cetona nos compostos de fórmulas (VII) (R_0 é =O).

A introdução de um substituinte de azoto em R_2 é efectuada pela reacção de um amino-aldeído de fórmula (V), sob condições redutoras, com um éster de um ácido aminoalcanóico C_{1-4} ou ácido alquil aminoalcanóico C_{1-4} , ou uma estrutura onde a porção amino está incluída num anel de 5 ou 6 membros saturado ou insaturado. Exemplos de tais aminas são os ésteres de benzilo ou metilo de glicina, alanina, ácido 3-amino-propiónico, ácido 4-amino-pentanóico, ácido butanóico, prolina, Δ^3 -desidro-prolina, e 2-carboxi-piperidina. Condições redutoras adequadas incluiriam o uso de hidrogénio e de um catalisador de paládio ou platina, ou cianoboro-hidreto de sódio. Consequentemente, os compostos de fórmula (VIII):



(VIII)

em que R_1 , R_5 , R_6 , X e n são tal como definidos na fórmula (IIa), são preparados por um processo que compreende a reacção de um composto de fórmula (V), sob condições redutoras, com um éster ou ácido de prolina, Δ^3 -desidro-prolina ou 2-carboxipiperidina, e,



-36-

em seguida, em qualquer ordem, conversão do éster num ácido carbóxico, éster, aldeído ou amida; ou conversão do ácido num éster, amida, anidrido ou haleto de acilo.

A introdução de um substituinte de enxofre em R_2 é executada por reacção de um éster ou ácido tioalcanóico com um derivado de um aminoácido α . Consequentemente, um ácido hidroxí-amino de fórmula (IV) é convertido no haleto correspondente utilizando um reagente convencional, tal como o tribrometo de fósforo, oxícloreto de fósforo ou cloreto de tionilo, em presença de uma base, tal como trietilamina ou piridina, e tratado com o éster ou ácido tioalcanóico, novamente em presença de uma base. O sulfeto produzido deste modo pode ser adicionalmente oxidado num sulfóxido por tratamento com um agente oxidante suave, tal como o metaperiodato de sódio, ou numa sulfona, por tratamento com permanganato de potássio.

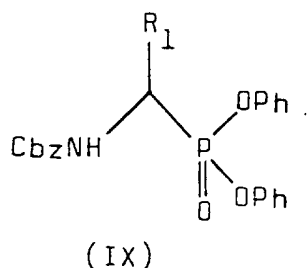
A introdução de um substituinte de fluorocarbono em R_2 , em que o flúor é γ para o grupo amino, é efectuada por tratamento de um aldeído de fórmula (V) com difluorobromoacetato de etilo e pó de zinco activado. Thaisrivongs e colab., J. Med. Chem., 29, 2080-87 (1986) descrevem tal química para os compostos do tipo da fluorostatina. Os homólogos destes compostos podem ser preparados a partir de α -cetodiésteres, tais como o oxaloacetato de dimetilo.

Ilustrando o método, o oxaloacetato de dimetilo é tratado com trifluoreto de dietilamino enxofre para produzir o succinato de α -difluorodimetilo. A redução preferencial da funcionalidade do α -difluoro éster com boro-hidreto de sódio produz o difluoro álcool, o qual pode ser oxidado no aldeído correspondente utilizando um método de oxidação suave, tal como o reagente de Collins, o periodinano de Dess-Martin ou o método de Swern (DMSO, cloreto de oxalilo, trietilamina). A condensação do α -difluoro aldeído com o composto de azoto de fórmula $R_1CH_2NO_2$, tal como 2-nitrofenil etano ou 1-nitro alcano C_{1-5} , em presença de uma base, tal como DBU ou K_2CO_3 , e redução subsequente do grupo azoto com hidrogénio e quer Pd a 5%/C quer catalisador de negro de platina, produz os homólogos de difluoro desejados. Os derivados alquilados destes homólogos podem ser preparados por alquilação do α -ceto diés

-37-

ter inicial com uma base e haleto de alquilo antes de dirigir a sequência. Por exemplo, a alquilação do oxalacetato de dimetilo com 2 equivalentes de iodeto de metilo em presença de DBU produz o succinato de 2-ceto-3,3-dimetilo. A conversão adicional pela sequência acima em butanoato de 2,2-dimetil-3,3-difluoro-4-oxo-metilo, a condensação com 2-fenilnitroetano e a redução com hidrogénio e Pd a 5%/C produz o hexanoato de 2,2-dimetil-3,3-difluoro-4-hidroxi-5-amino-6-fenil metilo. A oxidação posterior destes compostos para fornecer a fluorocetona pode ser levada a cabo neste estágio, mas é, muitas vezes, mais adequadamente efectuada após o resíduo ter sido incorporado nos péptidos. A oxidação de Moffatt (DMSO, anidrido acético), o periodinano de Dess-Martin ou a piridina/trióxido de crómio são oxidantes adequados.

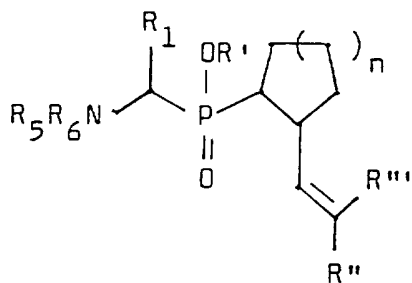
A introdução de um substituinte fosfonilo em R_2 é efectuada por uma condensação do carbamato de benzilo com fosfito de tri-fenilo e um aldeído de fórmula geral $R_1\text{CHO}$, tal como o fenilacetaldéido, isobutiraldeído ou 2-metilbutiraldeído, em ácido acético, para produzir um fosfonato de fórmula (IX).



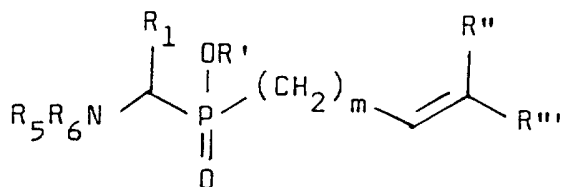
O tratamento adicional do fosfonato com um alquóxido fornece o éster de monoalquilo do ácido fosfónico correspondente. Assim, o tratamento com o metóxido de sódio produz o éster de mono-etilo de ácido fosfónico. A conversão deste ácido fosfónico no haleto de fosfonilo com um reagente de halogenação adequado, tal como cloreto ou brometo de tionilo, fornece um intermediário reactivo adequado para a elaboração posterior da cadeia lateral. O tratamento com um reagente organo-metálico, tal como o lítio ou o reagente de Grignard derivado do brometo de alquilo, bromo 3-butenol, 2-(2-metilpropenil)clorociclopentano ou 2-(2-metilpropenil)-ciclo-hexano, produz os fosfinatos de alquênol metilo de acordo

-38-

com este invento, tal como fornecidos pelas fórmulas (Xa) e (Xb):

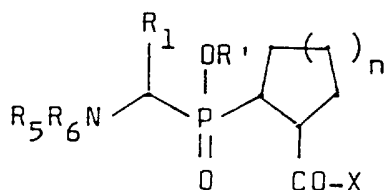


(Xa)

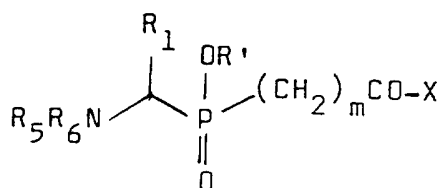


(Xb)

em que R_1 , R_5 , R_6 , R' , R'' , m e n são tal como definidos na fórmula (IIa) e R''' é alquilo C_{1-5} . A oxidação subsequente, por exemplo com permanganato de potássio ou por ozonólise como aqui anteriormente descrita, fornece os fosfinatos de alquilo de ácido carboxílico de acordo com este invento. Consequentemente, os compostos de fórmula (XI):



(XIa)



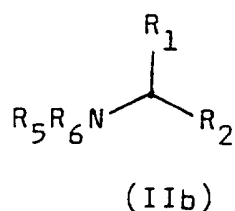
(XIb)

em que R_1 , R_5 , R_6 , R' , X e n são tal como definidos na fórmula (IIa), podem ser preparados por oxidação de um composto de fórmula (Xa) ou (Xb) num ácido carboxílico, facultativamente por hidrólise do fosfinato de alquilo no ácido fosfínico e facultativamente por conversão do ácido carboxílico num éster, amida, aldeído, anidrido ou haleto de acilo. A hidrólise do fosfinato de alquilo no ácido fosfínico pode ser alcançada por tratamento com um ácido forte, tal como o brometo de hidrogénio. Como seria óbvio para os especialistas na matéria, este método não é aplicável quando R_1 contém um substituinte de enxofre. Métodos adaptáveis para a síntese de alguns destes compostos são descritos, por exemplo, por Giannousis e colab., J. Med. Chem., 30, 1603-09 (1987).

Um aspecto adicional deste invento refere-se à preparação

-39-

de aminoácidos completamente novos os quais, quando adequadamente incorporados nos péptidos, fornecem uma imitação não hidrolisável de uma ligação peptídica. Estes compostos são preparados tal como anteriormente aqui descrito e estão adicionalmente ilustrados nos Exemplos que se seguem. Eles são incorporados nos péptidos de acordo com este invento por métodos conhecidos na especialidade e são apresentados pela fórmula (IIb) como:

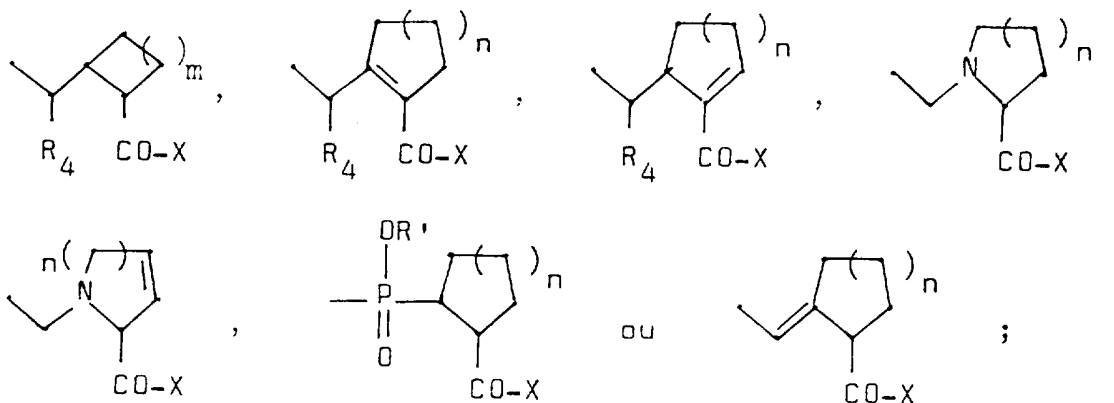


em que:

R_1 é, independentemente, $AlqC_{1-5}$, $-(CH_2)_n SA1qC_{1-5}$, $-(CH_2)_n OA1qC_{1-5}$, $-(CH_2)_n$ cicloalquilo C_{3-7} ou $-(CH_2)_m C_6H_4-R_a$;

R_a é halogéneo, NO_2 , OH , $OA1qC_{1-5}$, NH_2 , ou H ;

R_2 é $(CH_2)_n-X$, $(CH_2)_n CO-X$, $CHR_3 CHR_1 CHR' (CH_2)_m CO-$, $COCHR_1 CHR' (CH_2)_m CO-X$, $CHR_3 CF_2 (CH_2)_m CO-X$, $COCF_2 CR'R'' (CH_2)_m CO-X$, $CHR_3 (CH_2)_m CO-X$, $CO(CH_2)_m CO-X$,



R_3 é H , NH_2 ou OH ;

R_4 é H , NH_2 , OH ou $=O$;

R_5 é H ;

R_6 é CH_3CO , $AlqC_{1-5}$, Dns , Cbz ou Boc , ou, quando tomados

-40-

em conjunto, R_5 e R_6 são ftalimida;

X é H, halogéneo, OH, $OA1qC_{1-5}$, $NHR'R''$ ou $OCOAlqC_{1-5}$;

R' e R'' são H ou $AlqC_{1-5}$;

m é, independentemente, 0, 1, 2 ou 3; e

n é, independentemente, 1 ou 2;

desde que R_2 não seja CHR_3CH_2CO-X , $COCH_2CO-X$, $COCF_2CO-X$ ou CHR_3CF_2CO-X , quando R_1 é fenilmetileno, isobutilo ou ciclo-hexilmetileno, e R_2 não seja $CH(OH)CH_2CH_2CO-X$ ou $COCH_2CH_2CO-X$, quando R_1 é isobutilo.

A incorporação de um composto de fórmula (IIb) num péptido em lugar de um ou dois resíduos de aminoácido que sofrem clivagem por uma protease, especialmente uma protease retroviral, fornece um método para produção de actividade inibitória da protease. Será apreciado que os métodos de síntese acima introduzam centros quirais de uma forma não-selectiva ou racémica. Como é muitas vezes o caso em sistemas biológicos, uma configuração única de centros quirais é geralmente satisfatória. Em muitos dos compostos, existe mais do que um centro quiral, o que torna os compostos com centros quirais variáveis diastereoméricos. Estes diastereómeros são geralmente separáveis por cromatografia em gel de sílica ou um suporte cromatográfico de octadecil silano com uma fase móvel adequada. Se é utilizado o gel de sílica, é usada uma mistura de acetato de etilo e hexano ou metanol e clorofórmio ou cloreto de metileno para eluir os diastereómeros. Se é utilizado um suporte de octadecil silano, pode ser usada uma mistura de água e metanol ou acetonitrilo para purificar os diastereómeros. No caso de compostos ácidos ou básicos, a fase móvel pode ser tamponada pela adição de 0,02 a 0,5% de ácido acético, ácido trifluoroacético ou tampão fosfato. Se o resíduo, designado como M, possui apenas um centro quiral único, ou se os diastereómeros são difíceis de separar, será preferível incorporar o resíduo no péptido, em que os centros quirais dos outros aminoácidos constituintes conferem assimetria adicional e tornam os diastereómeros resultantes separáveis num estágio mais tardio. Contudo, enquanto pode ser, por vezes, preferível separar os diastereómeros, não é por qualquer meio ne-

-41-

cessário separar os centros quirais para aplicar este invento.

Os aminoácidos não naturais do resíduo M são incorporados nos péptidos de acordo com este invento, tal como anteriormente aqui descrito, por métodos comuns na especialidade relacionada com os péptidos.

Se o péptido final, após ter sido desprotegido, contém um grupo básico, pode ser preparado um sal de adição de ácido. Os sais de adição de ácido dos péptidos são preparados de uma maneira padrão num solvente adequado a partir do composto de origem e de um excesso de um ácido, tal como clorídrico, bromídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, maleico, succínico ou metano-sulfónico. A forma do sal acetato é especialmente útil. Se o péptido final contém um grupo ácido, podem ser preparados sais catiónicos. Tipicamente, o composto de origem é tratado com um excesso de um reagente alcalino, tal como um hidróxido, carbonato ou alquóxido, contendo o catião apropriado. Os catiões, tais como Na^+ , K^+ , Ca^{++} e NH_4^+ são exemplos de catiões presentes em sais farmacêuticamente aceitáveis. Alguns dos compostos formam sais, internos ou zwitteriônicos que também podem ser aceitáveis.

Os compostos de fórmula (I), em que M é $-\text{HNCHR}_1\text{R}_2-$, são utilizados para induzir a actividade anti-viral em doentes que estão infectados com vírus susceptíveis e requerem o referido tratamento. O método de tratamento compreende a administração por via oral, parentérica, bucal, trans-dérmica, rectal ou por insuflação, de uma quantidade eficaz do composto escolhido, preferivelmente disperso num veículo farmacêutico. As unidades de dosagem do ingrediente activo são seleccionadas a partir da variação de 0,05 a 15 mg/kg. Estas unidades de dosagem podem ser administradas uma a dez vezes diariamente para a infecção aguda ou crónica.

As propriedades de inibição da protease dos péptidos de acordo com este invento, em que M é $-\text{HNCHR}_1\text{R}_2-$, são demonstradas pela sua capacidade para inibir a hidrólise de um substrato peptídico pela protease do rHIV entre os limites de cerca de 10 nM e de cerca de 250 μM . A tabela seguinte é representativa das constantes de inibição destes péptidos.

Tabela IIInibição da protease de rHIV

<u>Composto do Exemplo Nº.</u>	<u>K_i (µM)</u>
15	14
16	1
17	68
18	6,7
19	7
20	32
21	160
22	47
23	27
24	6
25	40
26	60
27	0,26
28	0,026
29	≥ 28
30	14
31	1,2
32	220
33	3,6
34	0,140
35	0,110
36	10
37	3,5
38	0,15

As composições farmacêuticas dos péptidos de acordo com este invento, ou dos seus derivados, podem ser formuladas como soluções ou pós liofilizados para administração parentérica. Os pós podem ser reconstituídos por adição de um diluente adequado ou outro veículo farmacêuticamente aceitável, antes da utilização. A formulação líquida é geralmente uma solução aquosa tamponada e isotónica. Exemplos de diluentes adequados são o soro fisiológico-

co isotônico, dextrose a 5% padrão em água ou solução de acetato de sódio ou amônio tamponado. A referida formulação é especialmente adequada para a administração parentérica, mas também pode ser utilizada para a administração oral ou ser colocada num inalador ou nebulizador com doseador para insuflação. Poderá ser desejável adicionar excipientes tais como polivinilpirrolidona, gelatina, hidroxilcelulose, goma arábica, polietileno glicol, manitol, cloreto de sódio ou citrato de sódio.

Uma composição preferida para administração parentérica pode compreender, adicionalmente, uma quantidade do composto encapsulado num veículo lipossômico. O lipossoma pode ser formado pela dispersão dos péptidos numa fase aquosa com fosfolípidos, com ou sem colesterol, utilizando uma variedade de técnicas, incluindo agitação manual convencional, extrusão a alta pressão, evaporação de fase invertida e microfluidificação. Um método adequado de preparação das referidas composições é mais completamente descrito no Pedido co-pendente com o Nº. de Série 06/763 484 e é aqui incorporado por referência. O referido veículo pode ser facultativamente dirigido para o seu local de acção por uma imunoglobulina ou proteína reactiva com a partícula viral ou as células infectadas. A escolha das referidas proteínas seria, evidentemente, dependente das determinantes antigénicas do vírus infectante. Um exemplo da referida proteína é a glicoproteína da célula T CD-4, ou um seu derivado tal como a sCD-4 (CD-4 solúvel), a qual é reactiva com o envólucro glicoproteico do vírus de imunodeficiência humana (HIV). As referidas proteínas estão descritas no Requerimento co-pendente com Nº. de Série 07/160 463, que é aqui incorporado por referência. Proteínas alvo semelhantes podem ser delineadas, por métodos conhecidos na especialidade, para outros vírus e são consideradas como estando dentro do âmbito deste invento.

Alternativamente, estes péptidos podem ser capsulados, comprimidos ou preparados numa emulsão ou xarope para administração oral. Veículos sólidos ou líquidos farmacêuticamente aceitáveis podem ser adicionados para aumentar ou estabilizar a composição, ou para facilitar a preparação da composição. Veículos lí-

-44-

quidos incluem xarope, óleo de amendoim, azeite, glicerina, soro fisiológico e água. Veículos sólidos incluem amido, lactose, sulfato de cálcio di-hidratado, magnésia branca, estearato de magnésio ou ácido esteárico, talco, pectina, goma arábica, ágar ou gelatina. O veículo também pode incluir um material de libertação controlada, tal como monoestearato de glicerilo ou diestearato de glicerilo, sozinho ou com uma cera. A quantidade do veículo sólido varia mas, preferivelmente, estará entre cerca de 20 mg e cerca de 1 g por unidade de dosagem. As preparações farmacêuticas são preparadas seguindo as técnicas convencionais de farmácia envolvendo trituração, mistura, granulação e compressão, quando necessária, para formas em comprimido; ou trituração, mistura e enchimento de formas em cápsula de gelatina dura. Quando é utilizado um veículo líquido, a preparação estará sob a forma de um xarope, elixir, emulsão ou uma suspensão aquosa ou não aquosa. A referida formulação líquida pode ser administrada directamente p.o. ou enchendo uma cápsula de gelatina mole.

Para administração rectal, um pó pulverizado dos péptidos de acordo com este invento pode ser combinado com excipientes tal como manteiga de cacau, glicerina, gelatina ou polietileno glicóis e moldado em supositórios. Os pós pulverizados também podem ser combinados com uma preparação oleosa, gel, creme ou emulsão, tamponada ou não tamponada e administrados através de um emplastro transdérmico.

Os Exemplos que se seguem servem para ilustrar este invento. Os Exemplos não se destinam, de forma alguma, a limitar o âmbito deste invento, mas são fornecidos para mostrar como se preparam e utilizam os compostos de acordo com este invento.

Nos Exemplos, todas as temperaturas estão em graus Centígrados. As análises dos aminoácidos foram executados num Dionex Autoion 100. A análise do conteúdo peptídico é baseada na Análise dos Aminoácidos. Os espectros de massa FAB foram efectuados num espectrómetro de massa VG Zab utilizando bombardeamento de átomos rápido. As abreviaturas utilizadas para representar a composição do eluente para a cromatografia de camada fina e distri-

-45-

buição em contracorrente são B: n-butanol, A: ácido acético, W: água, E: acetato de etilo e IP: isopropanol. A RMN foi registada a 250 MHz utilizando um espectrómetro Bruker AM 250. As multiplⁱcidades indicadas são: S=singuleto, d=duplete, t=tripleto, q=quar^uteto, m=múltiplo e br indica um sinal amplo. O ácido 4(S)-amino-3(R)-hidroxi-5-fenil hexanóico [AHPPA] e o seu epímero 3(R) [3-R-AHPPA] foram preparados pelo método de Rich e colab., J. Med. Chem., 23, 27-33 (1980). O racemato [3-R,S-AHPPA] foi obtido pela omissão da cromatografia final neste método.

Purificação da protease de HIV recombinante

Os métodos para expressar a protease de HIV recombinante em E. coli foram descritos por Debouck e colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 8903-6 (1987). O enzima utilizado para testar o péptido de acordo com este invento foi produzido deste modo e purificado a partir do sedimento celular, como se segue. O sedimen^uto celular de E. coli foi resuspenso num tampão constituído por Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; DTT, EDTA e PMSF (fluoreto de fenilmetil sulfonilo), 1,0 mM de cada. As células foram lisadas por sonica^ção e o material insolúvel foi removido por centrifugação a 15 000 x g médio, durante 15 min. O sobrenadante clarificado foi então levado até à saturação de 40% com sulfato de amónio. Esta suspensão foi agitada à temperatura ambiente durante 30 min. e, em seguida, centrifugada como acima. O precipitado resultante foi redissolvido/ressuspenso num volume mínimo de Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 200 mM; DTT e EDTA, 0,1 mM de cada. A amostra foi novamente centrifugada antes da aplicação (em alíquotas de 5 ml) a uma coluna de filtração em gel de HPLC preparativa Beckman TSK G2000SW (2,1 cm x 60 cm). A coluna foi equilibrada no mesmo tampão a uma velocidade de fluxo de 4 ml/min. O efluente da coluna foi monitorizado a 280 nm e foram recolhidas fracções de 1 min. Tipicamente, a HIVPRTr (protease de HIV recombinante) eluiu 45-46 min para a corrente. Neste estágio, a protease era 85-95% pura. Por análise de imunomancha >90% do material imunorreactivo foi precipitado no passo do sulfato de amónio. Pela análise da acti^vidade, o pico de actividade mais alto foi encontrado nas fracções recolhidas aos 45 e 46 minutos. A análise das fracções da coluna

TSK por HPLC-RP e SDS-PAGE indicou que a maioria da proteína de 11 000 Mr também é encontrada nas fracções 45 e 46 minutos. A própria actividade não pode ser utilizada para obter dados de recuperação fidedignos dado que é influenciada pelo sal elevado, isto é, com sal aumentado foram obtidos níveis aumentados de actividade. Assim, com cada passo na purificação, foi recuperada mais actividade total do que aquela com que se iniciou. O rendimento global do HIVPRTr foi de 11 mg a partir de um sedimento celular de E. coli de 50 g.

Cinéticas do substrato para a actividade da protease de HIV

Os dados da velocidade inicial para os oligopéptidos foram determinados a pH 6,0, 37°C. As misturas reacionais (0,01-0,1 ml) continham Mes (ácido 2-N-morfolino)etano-sulfónico) 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, NaCl 0,2 M, Triton X-100 a 0,1% (v/v) (pH 6,0), DMSO a 10%, e concentrações variáveis dos péptidos. Após incubação a 37°C durante alguns minutos, a reacção foi iniciada pela adição de protease de HIV purificada (0,01-2 mg), e as reacções foram rapidamente arrefecidas após 10-30 min com um volume igual de, quer ácido tricloroacético 0,6 N quer ácido trifluoroacético a 0,2%, gelados. As amostras foram centrifugadas a 17 000 rpm durante 5 min e os substratos e produtos peptídicos foram separados e quantificados (por integração de pico) por HPLC de fase invertida. As velocidades iniciais foram determinadas como (produto peptídico formado mM)/min, baseado na percentagem de conversão do substrato no produto, para uma dada concentração do substrato. Tipicamente, as velocidades da reacção foram lineares em relação ao curso do tempo da reacção, e menos de 15-20% do substrato tinha sido convertido no produto no final da reacção. As constantes cinéticas (constantes de Michaelis, velocidades máximas) foram determinadas ajustando os dados da velocidade inicial à equação de Michaelis-Menten ($v = V_{\max}(S)/(K_m + (S))$), utilizando o programa Fortran de Cleland (W. W Cleland, Adv. Enzymol. 29, 1 (1967)). O número de renovação ("turner-over") (k_{cat}) foi obtido como $k_{\text{cat}} = V_{\max}/E_t$, onde é admitido que está presente um sítio activo por dímero 22-kD de protease de HIV.

-47-

Uma estimativa da viabilidade do substrato foi obtida por determinação de uma velocidade inicial relativa ($\text{rel } V_0$). Esta análise foi efectuada da mesma maneira, excepto por a percentagem de hidrólise do substrato após 10-20 min ter sido comparada com a percentagem de hidrólise de Ac-Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂ (controlo), após uma incubação semelhante. Isto estabeleceu uma comparação da velocidade reaccional inicial num ponto do tempo relativamente ao péptido de controlo.

Inibição da actividade da protease de HIV

Um ensaio típico continha 10 ml de tampão MENDT (Mes 50 mM (pH 6,0; ácido 2-(N-morfolino)etano-sulfónico), EDTA 1 mM, ditioneitol 1 mM, NaCl 200 mM, Triton X-100 a 0,1%); N-acetil-L-arginil-L-alanil-L-seril-L-glutaminil-L-asparaginil-L-tirosil-L-propil-L-valil-L-valinamida, 2, 3 ou 6 mM (Ac-Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂; $K_m = 7$ mM); e concentrações micromolares e sub-micromolares de compostos sintéticos. A seguir à incubação a 37°C durante alguns minutos, a reacção foi iniciada com 0,01-1 mg de protease de HIV purificada. As misturas reaccionais (37°C) foram rapidamente arrefecidas após 10-20 minutos com um volume igual de ácido tricloroacético 0,6 N gelado e, após centrifugação para remover o material precipitado, os produtos da peptidólise foram analisados por HPLC de fase invertida (Beckman Ultrasphere DDS, 4,5 mm x 25 mm; fase móvel: 5-20% de acetonitrilo/H₂O - TFA a 0,1% (15 min), 20% de acetonitrilo/H₂O - TFA a 0,1% (5 min) a 1,5 ml/min, detecção a 220 nm). As posições de eluição de Ac-Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂ (17-18 min) e Ac-Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Tyr (10-11 min) foram confirmadas com material autêntico. As velocidades iniciais de formação de Ac-Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Tyr foram determinadas a partir da integração destes picos e, tipicamente, as propriedades inibitórias dos compostos sintéticos foram determinadas a partir da análise do declive/ordena da origem de um gráfico de $1/v$ versus $[inibidor]$ (Análise de Dixon). Os valores de K_i resultantes deste tipo de análise primária são exactos apenas para os inibidores competitivos e sob condições em que a constante de Michaelis do substrato utilizado é bem determinada.

Exemplo 1Procedimento geral para a síntese peptídica de fase sólida

As amidas peptídicas são sintetizadas por síntese peptídica de fase sólida utilizando resina de benz-hidrilamina como suporte. Os aminoácidos protegidos são adicionados sequencialmente, a partir do terminal carboxilo, até que a sequência desejada tenha sido obtida. O grupo t-butiloxicarbonilo (Boc) é utilizado para protecção do grupo amina α . Os grupos funcionais das cadeias laterais são protegidos como se segue: arginina e histidina, tosilo (Tos); cisteína, p-metilbenzilo (MeBzl); serina e treonina, éter benzílico (Bzl); lisina, p-clorocarbobenzoxi (Clz); ácido glutâmico e ácido aspártico, éster de benzilo (OBzl); tirosina, p-bromocarbobenzoxi (BrZ). A remoção do grupo Boc é efectuada com ácido trifluoroacético (TFA) a 50% em cloreto de metileno. A neutralização do sal de TFA-amina é executada por tratamento com diisopropilamina (DIEA) a 7% em cloreto de metileno. Os aminoácidos são acoplados ao péptido em crescimento utilizando 3 equiv. de a monoácido-Boc, 3 equiv. de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) em DMF e 3 equiv. de diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) em cloreto de metileno. A perfeição da ligação é verificada pelo teste da ninhidrina e as ligações são repetidas, se necessário. O protocolo geral é dado abaixo.

- | | |
|--|-------------|
| 1. Lavagem com CH_2Cl_2 | 1 x 1 min. |
| 2. Lavagem com TFA a 50% | 1 x 1 min. |
| 3. Desbloqueio com TFA a 50% | 1 x 20 min. |
| 4. Lavagem com CH_2Cl_2 | 6 x 1 min. |
| 5. Neutralização com DIEA a 7% | 3 x 2 min. |
| 6. Lavagem com CH_2Cl_2 | 4 x 1 min. |
| 7. Lavagem com DMF | 2 x 1 min. |
| 8. Boc-AA + HOBt em DMF | não drenar |
| 9. DCC em CH_2Cl_2 | 2 h. |
| 10. Lavagem com DMF | 2 x 1 min. |
| 11. Lavagem com CH_2Cl_2 | 3 x 1 min. |

Para ligação do primeiro resíduo (terminal C) à resina BHA, a síntese começa no passo 5. Para todos aminoácidos subse-

-49-

quentes, a síntese inicia-se no passo 1.

Preparação de Ac-Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

A resina-nonapéptido protegido Boc-Arg(Tos)-Ala-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada da forma usual. Após remoção do grupo Boc do terminal N com TFA a 50% em CH₂Cl₂ e neutralização do sal de TFA resultante com DIEA a 7% em CH₂Cl₂, o péptido ligado à resina foi acetilado com anidrido acético (2 ml) em CH₂Cl₂ (30 ml) durante 30 minutos.

O péptido foi clivado da resina com remoção dos grupos protectores das cadeias laterais por tratamento com HF líquido anidro (10 ml) em presença de anisol (1 ml), a 0°C durante 50 minutos. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter etílico e seca ao ar. A resina foi então extraída com 2 x 30 ml de HOAc a 1%/H₂O, seguida por 2 x 30 ml de HOAc a 10%/H₂O. Os extractos combinados foram liofilizados produzindo 476 mg do péptido em bruto.

O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente utilizando o sistema n-BuOH/HOAc/H₂O 4:1:5. As fracções apropriadas foram reunidas, evaporadas até à secura e o resíduo foi liofilizado de HOAc a 1%/H₂O produzindo 294 mg do péptido parcialmente purificado. Uma alíquota de 100 mg do péptido parcialmente purificado foi adicionalmente purificada por filtração em gel numa coluna de Sephadex^R G-15 de 2,6 x 70 cm, utilizando HOAc a 1% como eluente. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas produzindo 89 mg do composto do título purificado.

TLC (n-BuOH/HOAc/H₂O 4:1:1) R_f=0,49.

HPLC: (Hamilton PRP-1, CH₃CN/H₂O/TFA a 0,1%, 5% a 40% de CH₃CN, 15 minutos, gradiente linear, 1,5 ml/min.) k'=2,6; FAB-MS: m/z 1074 (M+H⁺).

Exemplo 2

Preparação de (2S)-N-(2-N-terc-butiloxycarbonil)amino-3-fenil)propil-prolina

Éster de metilo de N-terc-butiloxycarbonil-L-fenilalanina

-50-

a) O cloridrato do éster de metilo de L-fenilalanina (10,0 g, 46,4 mmol) foi dissolvido numa mistura de trietilamina (12,9 ml, 92,8 mmol) e DMF (60 ml). Bicarbonato de N-t-butilo (16,0 ml, 69,6 mmol, excesso de 50%) foi adicionado durante 5 min. à temperatura ambiente. Após agitação durante 16 h, a mistura foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida. A cromatografia flash sobre gel de sílica utilizando EtOAc a 20% em hexano forneceu 13,0 g do composto do título.

TLC: (EtOAc a 20% em hexano) $R_f=0,31$.

RMN ($CDCl_3$): δ 7,23 (m, 5H), 5,16 (d, 1H, $J=8$ Hz), 4,57 (q, 1H, $J=7$ Hz), 3,66 (s, 3H), 3,07 (d, 2H, $J=6$ Hz), 1,40 (s, 9H).

N-terc-butiloxicarbonil-L-fenilalaninal

b) Boc-Phe-OMe (12,9 g, 46,4 mmol), preparada como acima, foi dissolvida em tolueno seco (50 ml) e arrefecida até $-78^\circ C$. Hidreto de diisobutilalumínio (25% em tolueno, 77,3 ml, 116 mmol, excesso de 150%) foi adicionado durante 2 min. Após agitação durante 15 min a $-78^\circ C$, foi adicionado metanol (15 ml), lentamente, para controlar a efervescência. A mistura foi vertida em sal de Rochelle (94 g de tartarato de sódio e potássio em 1 l de água, 150 ml) e agitada com éter (100 ml) até ser extraível. A fase aquosa foi lavada com éter (3 x 100 ml). As fases orgânicas foram combinadas, secas ($MgSO_4$) e evaporadas. O produto resultante foi utilizado directamente no passo seguinte.

TLC: EtOAc a 20% em hexano) $R_f=0,21$

RMN ($CDCl_3$): δ 9,69 (s, 1H), 7,28 (m, 5H), 5,05 (s, 1H), 4,43 (q, 1H, $J=7$ Hz), 3,10 (d, 2H, $J=7$ Hz), 1,43 (s, 9H).

Éster de benzilo de (2S)-N-(2-(N-terc-butiloxicarbonil)amino-3-fenil)propil-L-prolina

c) O aldeído em bruto, preparado como acima, 2(b), foi dissolvido em ácido acético a 1% em metanol (250 ml) com cloridrato de éster de benzilo de prolina (18,1 g, 75 mmol). Cianoborohidreto de sódio (3,06 g, 48,7 mmol, excesso de 5%) foi adicionado, e a mistura foi deixada, sob agitação, à temperatura ambiente durante 16 horas. A solução foi então evaporada e o resíduo foi

-51-

dividido entre EtOAc e HCl 1N. A camada orgânica foi lavada com HCl 1N (2x), NaHCO₃ 1N (3x), e água (1x). A evaporação da fase orgânica originou 13,5 g do éster de benzilo do título. A cromatografia flash de uma porção do material em bruto (gel de sílica, EtOAc a 20% em hexano) forneceu o produto puro o qual foi cristalizado de CHCl₃ e hexano. Estes cristais forneceram uma estrutura do cristal aos raios X satisfatória (S,S).

p.f.: 79-79,5°C.

TLC: (EtOAc a 20% em hexano); $R_f=0,31$.

RMN (CDCl₃): δ 7,33 (s, 5H), 7,20 (s, 5H), 5,14 (s, 2H), 4,95 (d, 1H, J=9 Hz), 4,05 (d, 1H, J=7 Hz), 3,17 (m, 2H), 2,63 (m, 5H), 1,87 (m, 4H), 1,35 (s, 9H).

MS: m/z 439 (M+H)⁺, 383, 365, 347, 339, 303, 231, 218, 91, 79.

Anal. calculado para C₂₆H₃₄N₂O₄: C, 71,21; H, 7,81; N, 6,39; Encontrado C, 71,00; H, 7,83; N, 6,25.

(2S)-N-(2-(N-terc-butiloxicarbonil)amino-3-fenil)propil-L-prolina

d) O dipéptido reduzido protegido (0,44 g, 1,0 mmol), preparado tal como acima, 2(c), foi dissolvido em metanol (100 ml) com Pd a 10%/C (0,50 g) e hidrogenado, sob H₂ a $3,1 \times 10^5$ Pa, durante 1 h. A mistura foi filtrada e concentrada originando 0,35 g (100%) do composto do título.

TLC: (:A:W 4:1:1); $R_f=0,66$.

RMN (DMSO-d₆): δ 7,26 (s, 5H), 6,80 (d, 1 H, J=9 Hz), 6,00 (s, 2H), 3,78 (s, 1H), 2,9 (m, 6H), 1,85 (m, 4H), 1,30 (s, 9H).

Executando a mesma sequência, excepto substituindo por piperidina-2-carboxilato de benzilo o éster de benzilo de prolina, produziu-se ácido (2S)-N-(2-(N-t-butiloxicarbonil)amino-3-fenil)propilpiperidino-2-carboxílico.

Executando a sequência 2(a)-2(c), excepto substituindo por éster de metilo de Δ^3 -desidro-prolina o éster de benzilo de prolina, produziu-se metil (2S)-N-(2-(N-t-butiloxicarbonil)amino-3-fenil)propil-L-prolina. A saponificação do éster de metilo com 5 equivalentes de K₂CO₃ em metanol:água 4:1 originou 2(S)-N-(2-(N-t-butiloxicarbonil)amino-3-fenil)propil-L-prolina.

-52-

Exemplo 3

Preparação de ácido (1R,2R)-2-(((2S)-2-terc-butiloxicarbonilamino-3-fenil-1-oxo)propil)ciclopentanocarboxílico

6-carbometoxibiciclo[3.1.0]hexano

a) Diazoacetato de etilo puro (53 ml, 0,50 mol) foi adicionado, por meio de um propulsor de seringa, durante um período de 4 horas, a uma mistura agitada do dímero de acetato de ródio (1,0 g, 0,0023 mol) e ciclopenteno (250 ml, 2,5 mol) imersa em banho-maria a 20-25°C. Após mais 30 minutos, o ciclopenteno em excesso foi removido por evaporação rotatória. O resíduo foi diluído com CH₂Cl₂, filtrado através de Celite® e concentrado por evaporação rotatória. O resíduo foi destilado a 44-46°C/66,7 Pa para fornecer o composto do título (46,5 g, 0,302 mol) como uma mistura de epímeros de carboetoxi, com rendimento de 60%.

TLC: (Hexano: acetato de etilo - 80:20) R_f=0,67.

RMN (CDCl₃): δ 4,1 (2H, quartetos em sobreposição), 2,0-1,5 (7H, m), 1,45-1,1 (5H, m).

6-(1-hidroxi-1-metiletil)biciclo[3.1.0]hexano

b) Uma solução 1,4 M de metil lítio em éter (350 ml, 0,50 mol) foi agitada rapidamente sob Ar a -78°C, enquanto o produto do Exemplo 3(a) (27,67 g, 0,180 mol) foi adicionado puro, por meio de seringa, durante um período de 15 minutos. A mistura foi agitada durante 1 hora a -78°C, em seguida foi deixada aquecer até à temperatura ambiente durante um período de 2 horas. Água (400 ml) foi adicionada, cautelosamente, seguida por HCl 3N (cerca 200 ml) até que a solução se tornou neutra. A camada do éter foi separada e a camada aquosa foi extraída, duas vezes, com éter. Os extractos do éter combinados foram secos sobre MgSO₄ e concentrados por evaporação rotatória. O resíduo foi destilado (80°C/-90°C/1999,8 Pa) fornecendo o produto do título (19,79 g, 0,141 mol) como uma mistura de epímeros, com rendimento de 79%.

TLC: (Hexano: acetato de etilo - 80:20) R_f = 0,36, 0,17.

RMN (CDCl₃): δ 2,0 - 1,6 (5H, m), 1,5 - 1,0 (9H, m), 0,55 (1H, m).

(+)-trans-2-(2-metilpropenil)clorociclopentano

c) Uma solução do produto do Exemplo 3(b), acima, (19,6 g, 0,140 mol) em THF (125 ml, foi adicionada, de uma só vez, a uma mistura, sob agitação rápida, de HCl aquoso a 37% (250 ml) e THF (125 ml), arrefecida num banho de gelo. Após 3,5-4,0 minutos, a mistura foi vertida em salmoura (1 l) e foi rapidamente extraída com pentano (3 x 250 ml). Os extractos do pentano foram lavados com NaHCO_3 a 5% (200 ml), secos sobre MgSO_4 e concentrados por evaporação rotatória (25°C/15 mm). O resíduo foi destilado a 78°C-80°C/1999,8 Pa, através de uma coluna Vigreux de 20,32 cm, originando o composto do título (18,65 g, 0,118 mol), com rendimento de 84%.

TLC: (hexano) $R_f=0,71$

RMN (CDCl_3): δ 4,95 (1H, dm), 3,84 (1H, quarteto aparente) 2,87 (1H, quinteto aparente), 2,2 (1H, m), 2,07 - 1,75 (4H, m), 1,72 (3H, d; $J=1,2$ Hz), 1,68 (3H, d; $J=1,2$ Hz), 1,33 (1H, m).

GC-MS (isobutano): m/z 158 (M)⁺, 123 ($M+H-HCl$)⁺.

IR (película): 2980, 1455, 1382, 838 cm^{-1}

2-(2-metilpropenil)litiociclopentano

d) Um frasco de 50 ml seco adaptado com um condensador de refluxo foi purgado com Ar. Lítio pulverizado (0,34 g, 49 mmol; conteúdo de Na de 1%; 25 peso % de dispersão em óleo mineral) foi introduzido e foi lavado com 2 x 100 ml de pentano seco para remover o óleo mineral. Uma solução do produto do Exemplo 3(c) (1,58 g, 10,0 mmol) em pentano desgasificado por congelação-descongelação, seco, (20 ml) foi adicionada. A mistura foi agitada sob refluxo num banho de óleo a 55°C durante 19 horas e, em seguida, deixada assentar. O sobrenadante foi retirado por meio de uma seringa e filtrado, sob Ar, através de um filtro de vidro fritado seco. A solução amarelo claro resultante (17,6 ml) era de 0,45 M no composto do título por titulação contra mentol com 1,10-fenantrolina como indicador. O composto do título foi produzido com rendimento de 79%.

(1R,2R)-2-((2S)-2-terc-butiloxicarbonilamino-3-fenil-1-oxo)propil-2-metilpropenilciclopentano

e) A uma solução agitada de Boc-L-fenilalanina (1,59 g, 6,00 mmol) em éter (40 ml) a -78°C, sob Ar, foi adicionado n-butilítio (4,00 ml, 1,50 M em hexano; 6,00 mmol). Após 10 minutos, o produto do Exemplo 3(d) (37 ml, 0,32 M em pentano, 11,8 mmol) foi adicionado, gota a gota, durante um período de 10 minutos. Após 10 minutos, a solução foi aquecida até 0°C e agitada 1 hora e 45 minutos e, em seguida, foi adicionada água (200 ml) com agitação vigorosa. A mistura foi extraída com acetato de etilo e o produto em bruto foi purificado três vezes por cromatografia flash (hexano: acetato de etilo - 95:5) fornecendo o isômero B (0,356 g, 9,60 mmol; 16% de rendimento baseado na Boc-L-Phe), que eluiu em segundo lugar e o isômero A (0,314 g, 8,46 mmol; 14% de rendimento), que eluiu em primeiro lugar.

(isômero B)

(1R,2R)-2-((2S)-2-terc-butiloxicarbonilamino-3-fenil-1-oxo)propil-2-metilpropenilciclopentano

TLC: (hexano: acetato de etilo - 95:5) $R_f=0,19$.

RMN ($CDCl_3$): δ 7,28-7,08 (5H), 5,06 (1H, d; $J=7,8$ Hz; NH), 4,95 (1H, d; $J=9,6$ Hz; vinilo), 4,61 (1H, quarteto aparente), 3,11 (1H, m), 3,10 (1H, dd; benzílico), 2,83 (1H, dd; benzílico), 2,77 (1H, m), 2,05 - 1,25 (6H), 1,68 (3H; metilo), 1,62 (3H; metilo), 1,39 (9H, s; Boc).

MS (DCI/ NH_3): m/z 372 ($M+H$)⁺, 316, 272.

(isômero A)

(1S,2S)-2-((2S)-2-terc-butiloxicarbonilamino-3-fenil-1-oxo)propil-2-metilpropenilciclopentano

p.f. 42-44°C.

TLC: (hexano: acetato de etilo - 95:5) $R_f=0,26$.

RMN ($CDCl_3$): δ 7,27-7,08 (5H), 5,18 (1H, d; $J=7$ Hz; NH), 5,00 (1H, d; $J=9,3$ Hz; vinilo), 4,57 (1H, quarteto aparente), 3,05 (1H, dd; $J=13,9, 6,7$ Hz; benzílico), 2,95 (1H, dd; $J=13,9, 5,8$ Hz; benzílico), 2,79 - 2,58 (2H, m), 1,95-1,20 (6H, m), 1,70 (3H; metilo), 1,52 (3H; metilo), 1,41 (9H; Boc).

MS (DCI/ NH_3): m/z ($M+H$)⁺, 372, 316, 272.

ácido (1R,2R)-2-(((2S)-2-terc-butiloxicarbonilamino-3-fenil-1-oxo)propil)ciclopentanocarboxílico

f) Uma solução do produto do Exemplo 3(e) - isómero B (186 mg, 0,50 mmol) em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 4:1 (5 ml) foi agitada a -78°C , e foi introduzido ozono numa corrente até que uma cor azul persistisse (cerca de 2 min.). A solução foi purgada com árgon, foi adicionado $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ (0,5 ml) e a solução foi deixada aquecer até 20°C . Após 2 horas, os componentes voláteis foram removidos sob vácuo. O aldeído em bruto resultante foi dissolvido em 5 ml de acetona e tratado com reagente de Jones (0,25 ml, 0,2M), a 0°C com agitação durante 3 min. Foi adicionado isopropanol (0,2 ml). A mistura foi diluída com água e extraída com CH_2Cl_2 , e os extractos foram concentrados. A cromatografia flash (hexano:acetato de etilo 80:20, seguido por hexano:acetato de etilo:ácido acético 80:20:4) forneceu o composto do título (148 mg, 0,410 mmol), como um vidro, com rendimento de 82%.

p.f. 94,5-96°

TLC: (hexano:acetato de etilo:ácido acético 80:20:4) $R_f=0,27$.

RMN (CDCl_3): δ 7,26-7,13 (5H, m), 5,12 (1H, d; $J=8,0$ Hz), 4,70 (1H, quarteto aparente), 3,46-3,27 (2H, m), 3,16 (1H, dd; $J=14$ Hz, 6,2 Hz), 2,93 (1H, dd; $J=14,0$ Hz, 6,5 Hz), 2,14-1,67 (6H, m), 1,39 (12H, s).

MS (DCI/ NH_3): m/z 362 ($M+H$)⁺.

A execução da mesma sequência, excepto substituindo por ciclo-hexeno o ciclopenteno em 3(a), produziu ácido 2-(((2S)-2-terc-butiloxicarbonilamino-3-fenil-1-oxo)propil)ciclo-hexano-carboxílico.

Exemplo 4

Preparação de ácido (1S,2S)-2-(((2S)-2-terc-butiloxicarbonilamino-1-oxo-3-fenil)propil)ciclopentanocarboxílico

Pelo mesmo processo utilizado para preparar o composto do Exemplo 3(f), excepto pela substituição pelo isómero A (186 mg, 0,50 mmol) do Exemplo 3(c), foi obtido o composto do título (135 mg, 0,37 mmol), como um sólido branco, com rendimento de 75%.

-56-

TLC: (hexano: acetato de etilo:ácido acético 80:20:5) $R_f=0,41$.
RMN (CDCl_3): δ 7,32-7,12 (5H, m), 5,13 (1H, d; $J=8,1$ Hz), 4,71 (1H, quarteto aparente), 3,42 (1H, quarteto aparente), 3,22-3,08 (2H, m), 2,91 (1H, dd; $J=13,8, 6,9$ Hz; benzílico), 2,20-1,62 (6H, m), 1,38 (12H, s).

MS (DCI/ NH_3): m/z 362 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 323 ($\text{M}+\text{NH}_3+\text{H}-\text{tBu}$)⁺, 262, 120.

Exemplo 5

Preparação de ácido (1R,2R)-2-(((1R,2S)-1-hidroxi-2-terc-butiloxicarbonilamino-3-fenil)propil)ciclopentanocarboxílico

A uma solução do Exemplo 7(f) (216 mg, 0,598 mmol) em metanol (5 ml) a 0°C foi adicionado NaBH_4 (25 mg, 0,66 mmol), com agitação. Após 20 min., foi adicionado HCl diluído e a mistura foi extraída com CH_2Cl_2 produzindo o composto do título como uma mistura de epímeros (216 mg, 0,595 mmol), com rendimento de 100% e uma proporção de 2:1, aproximadamente.

RMN (CDCl_3): δ 7,35-7,15 (5H), 5,05 (1H; NH), 3,87-3,56 (2H), 2,95-2,60 (3H), 2,38 (1H), 2,19-1,55 (6H), 1,38 (9H).

MS (DCI/ NH_3): m/z 364 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 325, 308 ($\text{M}-\text{C}(\text{CH}_3)_3+\text{H}$)⁺, 264 ($\text{M}-\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3+\text{H}$)⁺, 183, 160, 120.

A execução da mesma redução sobre ácido 2-(((2S)-2-terc-butiloxicarbonilamino-3-fenil-1-oxo)propil)ciclo-hexanocarboxílico produziu o ácido 2-(((2S)-2-terc-butiloxicarbonilamino-3-fenil-1-hidroxi)propil)ciclo-hexanocarboxílico correspondente.

Exemplo 6

Preparação de ácido (1R,2R)-2-(((1S,2S)-1-hidroxi-2-terc-butiloxicarbonilamino-3-fenil)propil)ciclopentanocarboxílico

(1R,2R)-metil-2-(((1S,2S)-2-terc-butiloxicarbonilamino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentanocarboxilato

a) Uma solução dos epímeros do Exemplo 5 (140 mg, 0,386 mmol) em éter (5 ml) a 0°C foi tratada com diazometano etéreo em excesso, durante cerca de 5 min (até que uma cor amarela persistisse). Foi adicionado ácido acético (0,1 ml) e a solução foi concentrada por evaporação notatória. A separação por HPLC (ace-

-57-

tato de etilo:hexano 80:20) sobre sílica forneceu o isômero A (47,0 mg, 0,125 mmol), que eluiu em primeiro lugar, seguido pelo isômero B (50,6 mg, 0,134 mmol).

isômero A

(1R,2R)-metil-2-(((1S,2S)-2-terc-butiloxicarbonilamino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentanocarboxilato

TLC: (hexano:acetato de etilo - 2:1) $R_f=0,54$.

RMN (CDCl_3): δ 7,32-7,18 (5H, m), 4,85 (1H, d; $J=8,7$ Hz; NH), 3,72 (1H, m), 3,66 (3H, s), 3,52 (1H, dd), 2,90 (2H, d aparente; benzílico), 2,58 (1H, quarteto aparente), 2,40 (1H, m), 1,92-1,50 (6H, m), 1,39 (9H, s).

MS (DCI/ NH_3): m/z 378 ($M+H$)⁺, 339, 322 ($M-\text{C}(\text{CH}_3)_3+H$)⁺, 321, 304 ($M-\text{OC}(\text{OCH}_3)_3+H$)⁺, 278 ($M-\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3+H$)⁺, 120.

A configuração do hidroxí na posição 2 foi determinada como se segue. O isômero A foi convertido no seu derivado de oxazolidinona por tratamento com TFA para remover o grupo protector Boc, seguido por tratamento com fosgênio e trietilamina. Os hidrogénios do anel oxazolidinona tinham uma constante de ligação da RMN consistente com uma relação trans ($J=5,3$ Hz), a qual foi confirmada com uma falta observada em NOE, estabelecendo deste modo a configuração do hidroxí na posição 2 como sendo (S).

isômero B

(1R,2R)-metil-2-(((1R,2S)-2-terc-butiloxicarbonilamino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentanocarboxilato

TLC:(hexano:acetato de etilo - 2:1) $R_f=0,42$.

RMN (CDCl_3): 7,31-7,16 (5H, m), 4,92 (1H, d; $J=8,7$ Hz), 3,89 (1H, m), 3,72 (3H, s), 3,64 (1H, d aparente), 3,41 (1H, dd; $J=14,2$, 4,2 Hz; benzílico), 2,72 (2H, m), 2,36 (1H, quinteto aparente), 2,06-1,40 (6H, m), 1,32 (9H, s).

MS (DCI/ NH_3): m/z 378 ($M+H$)⁺, 322, 278, 120.

A configuração do hidroxí na posição 2 do isômero B foi determinada do mesmo modo que para o isômero A.

Num processo alternativo, os dois epímeros foram claramente separados por HPLC preparativa (coluna de sílica Rainin Dynamax^R 2,54 cm x 25 cm, 20 ml/min, hexano:acetato de etilo:ácido

-58-

fórmico - 75:25:1) para fornecer o isômero A (rendimento de 49%) e o isômero B (rendimento de 35%).

ácido (1R,2R)-2-(((1S,2S)-1-hidroxi-2-terc-butiloxicarbonilamino-3-fenil)propil)ciclopentanocarboxílico

b) A uma solução do isômero A do Exemplo 6(a) (23,7 mg, 63,2 mmol) em THF:água:metanol - 2:1:1 (2 ml) foi adicionado NaOH a 10% (cerca de 0,2 mmol). Após 2,5 horas, a mistura foi diluída com acetato de etilo e lavada com HCl a 5%. A secagem sobre MgSO₄ e a evaporação forneceram o composto do título (21,4 mg, 59,0 mmol), com rendimento de 94%.

p.f.: 120-122°C

TLC: (hexano:acetato de etilo;ácido acético 80:20:4) R_f=0,34.

RMN (CD₃OD): δ 7,23 (5H), 3,73 (1H, m), 3,53 (1H, m), 2,85 (1H, dd; benzílico), 2,73 (1H, dd; benzílico), 2,55 (1H, m), 2,37 (1H, m), 1,90-1,57 (6H), 1,35 (9H, s).

Exemplo 7

Preparação de ácido (1R,2R)-2-(((1R,2R)-2-(((1R,2S)-1-hidroxi-2-terc-butiloxicarbonilamino-3-fenil)propil)ciclopentanocarboxílico

Pelo processo do Exemplo 6(b), o isômero B do Exemplo 6(a) (20,1 mg, 53,6 mmol) forneceu o composto do título (19,3 mg, 53,2 mmol; rendimento de 99%).

p.f.: 133-135°C

TLC: (hexano:acetato de etilo:ácido acético - 80:20:4) R_f=0,27

RMN (CD₃OD): δ 7,21 (5H), 3,75 (1H, m), 3,49 (1H, dd), 2,96 (1H, dd; benzílico), 2,77-2,42 (3H), 1,95-1,83 (3H), 1,78-1,60 (2H), 1,50 (1H, m), 1,30 (9H, s).

Exemplo 8

Preparação de ácido (1S,2S)-2-(((1R,2S)-2-terc-butiloxicarbonilamino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentanocarboxílico

Utilizando o processo do Exemplo 5, excepto substituindo pelo composto do Exemplo 4 (38 mg, 0,105 mmol), foi obtido o composto do título (35,5 mg, 0,0978 mmol), numa proporção de 1:1

e com rendimento de 93%, como um sólido branco.

TLC: (hexano:acetato de etilo;ácido acético - 80:20:5) $R_f=0,26$.
RMN ($CDCl_3$): δ 7,32-7,14 (5H, m), 3,93-3,60 (2H, m), 3,38-3,21 (1H, dois multipletos), 3,05-2,70 (2H, m), 2,55-2,38 (1H, m), 2,35-1,54 (7H, m), 1,31-1,14 (9H, dois singuletos).

Exemplo 9

Preparação de cloridrato do metil éster de valil valina

Éster de metilo de fenilmetoxicarbonil-valil valina

a) Cloroformato de isobutilo (1,30 ml, 10,0 mmol) foi adicionado, gota a gota, durante 10 min, a uma solução agitada de N-Cbz-L-valina (2,51 g, 10,0 mmol) e N-metilmorfolina (1,21 ml, 11,0 mmol) em THF (30 ml), a $-40^\circ C$ sob árgon. Após 1 hora, foi adicionado cloridrato de éster de metilo de L-valina sólido (1,68 g, 10,0 mmol), seguido por mais N-metilmorfolina (1,21 ml, 11,0 mmol). A mistura foi agitada, com aquecimento até $20^\circ C$, durante 24 horas; em seguida foi filtrada e concentrada até um sólido por evaporação rotatória. A cromatografia flash (gradiente, 0 a 5% de CH_3OH em $CHCl_3$) forneceu o composto do título (3,44 g, 9,50 mmol) como um sólido branco, com rendimento de 95%.

RMN ($CDCl_3$): δ 7,34 (5H, m), 6,80 (1H, d), 5,62 (1H, d), 5,13 (2H, s), 4,56 (1H, dd), 4,17 (1H, dd), 3,74 (3H, s), 2,15 (2H, m), 1,00-0,88 (12H, dupletos em sobreposição).

Cloridrato de metil éster de valilvalina

b) Uma solução do composto do Exemplo 9(a) (535 mg, 1,47 mmol) em ácido acético (4 ml) foi agitada com Pd a 10% em carbono (50 mg), sob uma atmosfera de H_2 durante 5 horas. A mistura foi filtrada, diluída com CH_3OH , acidificada com HCl a 37% (0,2 ml), e concentrada sob vácuo até uma goma. O resíduo foi triturado com éter e seco sob vácuo, originando o composto do título (395 mg, 1,47 mmol) como um pó branco

RMN (CD_3OD): δ 4,36 (1H, d; $J=5,8 Hz$), 3,81 (1H, d; $J=5,7 Hz$), 3,73 (3H, s), 2,21 (2H, septeto), 1,09 (3H, d; $J=7,0 Hz$), 1,06 (3H, d; $J=6,9 Hz$), 0,998 (6H, dupletos em sobreposição), MS

-60-

(FAB + VE): M/z 231 ($M + H$)⁺, 188, 171, 132, 72, 55.

Exemplo 10

Preparação de terc-butiloxicarbonil-(O-fenilmetil)serilalanil alanina

Éster de metilo de terc-butiloxicarbonil-(O-fenilmetil)seril alanina

a) Cloroformato de isobutilo (2,59 ml, 20,0 mmol) foi adicionado, gota a gota, durante 15 min. a uma solução agitada de éster de N-Boc-L-serina-O-benzilo (5,90 g, 20,0 mmol) e N-metilmorfolina (2,74 ml, 25,0 mmol) em THF (100 ml) a -40°C, sob árgon. Após 45 minutos, foram adicionado N-metilmorfolina (2,75 ml, 25,0 mmol) e cloridrato de éster de metilo de L-alanina sólido (3,22 g, 23,0 mmol). A mistura foi deixada sob agitação, com aquecimento gradual até 20°C. Após 18 horas, a mistura foi diluída com acetato de etilo e lavada sucessivamente com HCl a 5%, NaHCO₃ a 5% e salmoura. A filtração e a remoção do solvente sob vácuo, forneceram o composto do título (7,54 g, 19,8 mmol) como um óleo, com rendimento de 99%.

TLC: (acetato de etilo:hexano 1:1) $R_f=0,5$.

RMN (CDCl₃): δ 7,32 (5H, m), 7,11 (1H, br m), 5,41 (1H, br m), 4,65-4,53 (3H, m), 4,30 (1H, br m), 3,92 (1H, dd; $J=9,2$ Hz, 3,9 Hz), 3,73 (3H, s), 3,58 (1H, dd; $J=9,2$ Hz, 616 Hz), 1,45 (9H, s), 1,39 (3H, d; $J=7,1$ Hz).

terc-butiloxicarbonil-(O-fenilmetil)seril alanina

b) Hidróxido de sódio (0,8 g, 20 mmol), em água (50 ml) foi adicionado fraccionadamente durante 2 horas, a uma solução do composto do Exemplo 10(a) (7,5 g, 19,7 mmol) em metanol:água 2:1 (225 ml). A agitação continuou durante mais uma hora até que a solução ficou aproximadamente neutra e TLC indicou a reacção como completada. A solução foi concentrada por evaporação rotatória, diluída com água e extraída com acetato de etilo. A camada aquosa foi acidificada com HCl a 10% e extraída, duas vezes, com acetato de etilo. A secagem sobre MgSO₄ e a concentração sob vácuo produziram o composto do título (6,89 g, 18,8 mmol), como um vi-

dro, com rendimento de 96%.

RMN (CDCl_3): δ 7,32 (5H, m), 5,62 (1H, largo), 4,60 (1H, m), 4,55 (2H, s), 4,36 (1H, largo), 3,87 (1H, dd), 3,61 (1H, dd), 1,46-1,40 (12H, m).

Éster de metilo de terc-butiloxicarbonil-(O-fenilmetil)serilalanil alanina

c) Cloroformato de isobutilo (2,42 ml, 18,8 mmol) foi adicionado, gota a gota, durante 18 min., a uma solução agitada do composto do Exemplo 10(b) (6,89 g, 18,8 mmol) e N-metilmorfolina (2,74 ml, 25,0 mmol) em THF (100 ml) a -40°C sob argon. Após 20 min., foram adicionados N-metilmorfolina (2,74 ml, 25,0 mmol) e cloridrato de éster de metilo de L-alanina sólido (3,07 g, 22,0 mmol). A mistura foi deixada sob agitação, com aquecimento gradual até 20°C , durante 20 horas; em seguida foi diluída com acetato de etilo e lavada sucessivamente com HCl a 5%, NaHCO_3 a 5% e água salgada. A filtração e a remoção do solvente sob vácuo produziu o produto em bruto (7,169 g), como um sólido. A recristalização (hexano:acetato de etilo 2:1) forneceu o composto do título (7,55 g, 16,7 mmol) com rendimento de 89%, como cristais brancos.

TLC: (acetato de etilo:hexano 1:1) $R_f=0,15$.

RMN (CDCl_3): δ 7,32 (5H, m), 7,00 (1H, d), 6,90 (1H, d), 5,44 (1H, d), 4,58 (2H, s), 4,54 (2H, m), 4,30 (1H, largo), 3,90 (1H, dd), 3,74 (3H, s), 3,64 (1H, dd), 1,44 (9H, s), 1,38 (6H, dupletos em sobreposição).

terc-butiloxicarbonil-(O-fenilmetil)serilalanil alanina

d) Hidróxido de sódio (0,25 g, 6,2 mmol) foi adicionado, fraccionadamente durante 4 horas, a uma solução do composto do Exemplo 10(c) (2,79 g, 6,19 mmol) em metanol:água 2:1 (75 ml), a uma velocidade tal que o pH permaneceu entre 7 e 9. A agitação continuou durante mais 10 horas e, em seguida, a solução foi concentrada por evaporação rotatória. Foi adicionada água e a solução foi extraída, duas vezes, com acetato de etilo. A camada aquosa foi acidificada com HCl a 10% e extraída, três vezes, com acetato de etilo. A secagem (MgSO_4) do extracto orgânico e a remoção do solvente sob vácuo originaram o composto do título (2,58 g,

5,90 mmol), com rendimento de 95%), como um pó branco.

RMN (CDCl_3): δ 7,30 (7H, m; aromático + NH), 5,57 (1H, largo), 4,64-4,46 (4H, m), 4,38 (1H, largo), 3,86 (1H, dd), 3,65 (1H, dd), 1,44 (9H, s), 1,39 (6H, dupletos em sobreposição), MS (FAB + VE): m/z 438 ($M+H$)⁺, 382, 338, 293, 249, 221, 203.

MS (FAB-VE): m/z ($M-H$)⁻, 336, 254.

Exemplo 11

Preparação de ácido trans-2-((1-metoxi-1-(2-fenil-1-fenilmetoxi-carbonilamino)etil)fosfinil)ciclopentanocarboxílico

ácido (+)-2-fenil-1-fenilmetoxycarbonilaminoetil fosfónico, éster de monometilo

a) Fosfonato de (+)-difenil-(2-fenil-1-fenilmetoxycarbonilamino)etilo foi preparado como descrito em Synthesis, 985 (1979). Resumidamente, uma mistura de fosfito de trifenilo (0,1 mol), fenilacetaldeído (0,15 mol, destilado recentemente), carbamato de benzilo (0,1 mol) e ácido acético glacial (15 ml) foi agitada durante 1 hora até que a reacção exotérmica acalmasse. A mistura foi então aquecida a 80-85°C durante 1 hora e os produtos voláteis foram removidos num evaporador rotatório sob pressão reduzida, com aquecimento num banho-maria em ebulição. O resíduo oleoso foi dissolvido em metanol (180 ml) e deixado para cristalização a -10°C. Após 1-3 horas, o éster cristalino foi recolhido por filtração e recristalizado por dissolução numa quantidade mínima de clorofórmio quente (30-40 ml) e adição de um volume 4 vezes superior de metanol.

Uma porção do fosfonato de difenilo resultante (2,44 g, 5,00 mmol) foi agitada durante 2 dias em metanol (75 ml) com metóxido de sódio (1,6 g, 30 mmol). A solução foi diluída com HCl a 5% (250 ml) e extraída com éter. A camada do éter foi extraída com Na_2CO_3 a 5% e salmoura, sendo, em seguida, concentrado. O fosfonato de dimetilo em bruto foi agitado durante 1 dia como uma solução em 50 ml de metanol e 50 ml de NaOH a 10%. A solução foi acidificada com HCl a 10% (300 ml) e extraída com CH_2Cl_2 . A remoção do solvente forneceu um sólido que foi dissolvido em CHCl_3 quente (100 ml). Foi adicionado hexano (50 ml) e a solução foi

-63-

armazenada durante toda a noite a -20°C . Os cristais resultantes foram recolhidos por filtração originando o composto do título (1,53 g, 4,38 mmol), com rendimento de 88%.

Brometo de 2-(2-metilpropenil)ciclopentilmaqnésio

b) A uma suspensão, sob agitação, de aparas de magnésio (432 mg, 18 mmol) em éter seco (15 ml) e benzeno seco (5 ml), sob Ar num frasco equipado com um condensador de refluxo, foi adicionado 1,2-dibromoetano puro (1,55 ml, 18 mmol), cautelosamente e gota a gota, durante 30 min. Uma alíquota de 10,0 ml (9,0 mmol) da solução de MgBr_2 límpida resultante foi adicionada a uma solução a -78°C de 2-(3-metilpropenil)litociclopentano (o composto do Exemplo 3(d)) (8,6 mmol) em pentano (20 ml) e THF (20 ml). A mistura heterogênea resultante foi aquecida até 0°C , originando uma solução cor de laranja clara do reagente de Grignard correspondente (8,6 mmol), a qual foi reaquecida até -78°C para utilização no passo (b).

trans-2-(1-metoxi-1-(2-fenil-1-fenilmetoxicarbonilamino)etil)-fosfinil-2-metilpropenilciclopentano

c) A uma solução do composto do Exemplo 11 (a) (1,92 g, 5,50 mmol) em CH_2Cl_2 seco (15 ml), sob Ar, foi adicionado SOCl_2 (0,40 ml, 5,5 mmol). Após 2,5 horas, o solvente foi removido sob vácuo. O HCl residual foi removido por adição e re-evaporação de CH_2Cl_2 seco (10 ml), seguido por THF seco (10 ml). O cloreto de fosfonilo viscoso restante foi diluído com THF seco até um volume de 11,0 ml; uma alíquota da solução (8,6 ml, 4,3 mmol) foi adicionada, com agitação, a uma solução a -78°C de reagente de Grignard (8,6 mmol) tal como preparado no passo (a) acima. A mistura homogênea foi deixada sob agitação durante 1 hora a -78°C e, em seguida, 1 hora a -20°C . HCl a 10% aquoso (50 ml) foi adicionado, seguido por água (200 ml). A mistura foi extraída, três vezes, com éter. Os extractos do éter combinados foram lavados com NaHCO_3 a 5%, secos sobre MgSO_4 e concentrados até um óleo (2,1 g). A cromatografia flash (CHCl_3) forneceu o composto do título como uma goma (864 mg, 1,90 mmol; rendimento de 44%) e como uma mistura de quatro diastereómeros.

-64-

TLC: ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 25:1) $R_f=0,4$.

GC (coluna: CHROMPACK 51 mm x 0,22 mm i.d.; fase líquida CP sil 5 CB. Forno: 240°C): RT (área rel.) 4,04 (1,0), 4,17 (1,3), 4,42 (1,2), 4,58 (1,9).

RMN (CDCl_3): δ 7,35-7,03 (10H, m), 5,56-5,10 (1H, m; NH), 5,05-4,87 (3H, m), 4,33 (1H, m), 3,76-3,60 (3H, m), 3,29-2,69 (3H, m), 2,08-1,56 (12H, m), 1,29 (1H, m).

MS (DCI/NH_3): m/z 456 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, 378, 365, 348, 322, 213, 203, 120, 108, 91.

ácido trans-2-((1-metoxi-1-(2-fenil-1-fenilmetoxycarbonilamino)-etil)fosfinil)ciclopentanocarboxílico

d) Utilizando o processo de ozonólise do Exemplo 3(f), o composto anterior do Exemplo 11(c) (680 mg, 1,49 mmol) forneceu o composto do título como uma goma em bruto. A cromatografia flash ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 25:1, seguido por $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{ácido acético}$ 25:1:1) forneceu o produto puro (365 mg, 0,820 mmol), com rendimento de 55%, como uma espuma friável.

RMN (CDCl_3): δ 7,32-7,12 (10H, m), 5,00-4,91 (2H, m), 4,45 (1H, m), 3,78-3,64 (3H, m), 3,35-2,68 (4H, m), 2,08-1,60 (7H, m).

A execução da mesma sequência, excepto substituindo por 4-bromo-1-butenos o 2-(2-metil propenil)litiociclopentano, produziu o ácido 2-((1-metoxi-1-(2-fenil-1-fenilmetoxycarboxilamino)etilfosfinil)propanóico correspondente.

Exemplo 12

Preparação de ácido (5S)-4-oxo-5-(t-butoxycarbonilamino)-6-fenil-hexanóico

(6S)-7-fenil-6-(t-butoxycarbonilamino-hept-1-eno-5-ona

a) A uma solução sob agitação de pó de magnésio (1,82 g, 75 mmol) em éter dietílico seco (10 ml), sob argon, foram adicionadas diversas gotas de 4-bromo-1-butenos. Uma vez iniciado o refluxo espontâneo, foi adicionado 4-bromo-1-butenos (6,75 g, 50 mmol), gota a gota, a uma velocidade que mantivesse um refluxo suave. A mistura foi agitada durante mais 30 minutos com aquecimento até ao refluxo. Após arrefecimento, a solução de reagente de

-65-

Grignard foi adicionada a uma solução agitada de (Boc)-L-fenilalanina-N-metoxi-N-metilamida (1,0 g, 3,2 mmol) em éter dietílico seco (10 ml) a 0°C. Após 1,5 horas, a mistura reaccional foi diluída com HCl a 10% e extraída 3x com éter dietílico. A camada orgânica foi lavada sucessivamente com HCl 1 M, bicarbonato de sódio aquoso saturado e cloreto de sódio aquoso saturado, seca (MgSO_4) e evaporada sob pressão reduzida, originando o composto do título (780 mg, rendimento de 81,8%), como cristais brancos.

RMN (CDCl_3): δ 7,20 (5H, m); 5,73 (1H, m); 5,1 (1H, d); 5,05 (2H, m); 4,55 (1H, quarteto); 3,05 (2H, m); 2,48 (2H, quarteto); 2,30 (2H, m); 1,40 (9H, s).
MS (DP/NH_3): m/z ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 304; 248, 204, 120.

Ácido (5-S)-4-oxo-5-(t-butoxicarbonilamino)-6-fenil-hexanóico

b) Foi introduzido ozono numa solução do composto do Exemplo 12(a) (400 mg, 1,32 mmol) em $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 4:1 (5 ml) a -78°C, até que uma cor azul persistisse. A solução foi purgada com argon durante diversos minutos, sendo, em seguida, adicionado sulfeto de dimetilo (2 ml). A mistura foi aquecida até à temperatura ambiente durante 2 horas, sendo, em seguida, concentrada sob pressão reduzida até um óleo. O resíduo oleoso foi dissolvido em acetona e arrefecido, com agitação, até 0°C. O reagente de Jones (1,32 mmol, 2M soln.) foi adicionado, gota a gota. Após 5 minutos, foi adicionado isopropanol. A mistura foi diluída com H_2O e extraída 3x com diclorometano. A camada orgânica foi seca (MgSO_4), filtrada e concentrada até um óleo. A cromatografia flash sobre gel de sílica (hexano:acetato de etilo 60:40, seguido por hexano:acetato de etilo:ácido acético 65:35:5) forneceu o composto do título como um óleo (175 mg, rendimento de 41%).

RMN (CDCl_3): δ 7,24 (5H, m); 5,1 (1H, d); 4,55 (1H, quarteto); 3,05 (2H, m); 2,68 (5H, m); 1,38 (9H, s).
MS (FAB^+): m/z 322; (FAB^-): m/z 320.

Utilizando a mesma sequência, excepto substituindo por Boc-fenilglicina a Boc-(O-benzil)tirosina, originou ácido 4-oxo-5-(terc-butiloxycarbonil-amino)-5-fenilpentanóico.

-66-

Exemplo 13Preparação de ácido (5S)-4-oxo-5-(terc-butoxicarbonilamino)-6-(4-benziloxifenil)-hexanóicoBoc-(O-benzil)tirosina-N-metoxi-N-metil amida

a) a uma solução de Boc-(O-benzil)tirosina (7,42 g; 30,0 mmol) em CH_2Cl_2 seco (20 ml) foram adicionados trietilamina (3,0 ml, 21,5 mmol) e hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris (dimetilamino) fosfônio (6,96 g, 20,0 mmol). Após 10 minutos, trietilamina (3,0 ml, 21,5 mmol) e O,N-dimetil-hidroxilamina (2,15 g, 22,0 mmol). Após 16 horas, a solução foi diluída com acetato de etilo e lavada sucessivamente com HCl a 5%, bicarbonato de sódio aquoso saturado, e cloreto de sódio aquoso saturado. A solução orgânica foi seca (MgSO_4), filtrada e concentrada até uma espuma. A cromatografia flash sobre gel de sílica (hexano: acetato de etilo 50:50) forneceu o composto do título (5,87 g, rendimento de 71%) como um pó branco.

RMN (CDCl_3): δ 7,40 (5H, m); 7,02 (4H), dd; 5,12 (1H, d); 5,05 (2H, s); 4,90 (1H, largo); 3,62 (3H, s); 3,15 (3H, s); 2,92 (2H, m); 1,38 (9H, s).

MS: m/z ($M+H$)⁺ 415; 359, 341, 315

(6S)-7-(4-benziloxifenil)-6-(terc-butoxicarbonilamino)hept-1-eno-5-ona

b) A uma suspensão de pó de magnésio (6,68 g, 0,275 mol) em éter dietílico anidro (100 ml), sob uma atmosfera de argon, foram adicionadas diversas gotas de 4-bromo-1-buteno. Uma vez iniciado o refluxo espontâneo, foi adicionado 4-bromo-1-buteno (24,72 g, 0,183 mol) a uma velocidade que mantivesse um refluxo suave. Após terminar a adição, a mistura continuou sob refluxo durante mais 30 min. Foi preparada uma solução de t-butiloxycarboniltirosina-(O-benzil)-metoximetilamida (18,95 g, 0,046 mol) em THF anidro, que foi lentamente adicionada a 0°C, ao reagente de Grignard previamente preparado. Após 90 min, a reação estava completada, tal como indicado por TLC e foi rapidamente arrefecida com HCl aquoso a 10%. A mistura reaccional foi extraída com éter, três

-67-

vezes, e os extractos orgânicos combinados foram lavados sucessivamente com HCl 1 M, NaHCO₃ aquoso saturado, e NaCl aquoso saturado. A solução foi seca (MgSO₄), filtrada e evaporada sob pressão reduzida originando um sólido branco. A purificação por cromatografia de coluna em gel de sílica eluindo com acetato de etilo a 17%/hexano forneceu o composto do título como um sólido branco (18,1 g, 96%)

RMN (CDCl₃): δ 7,42 (5H, m); 6,96 (4H, dd); 5,72 (1H, m); 5,10 (1H, br d); 5,06 (2H, s); 4,95 (2H, m); 4,48 (1H, q); 2,95 (2H, m); 2,5-2,0 (4H, m); 1,38 (9H, s).
MS: m/z (M+H)⁺ 410, 371, 354, 310.

ácido (5S)-4-oxo-5-(terc-butoxicarbonilamino)-6-(4-benziloxifenil)-hexanóico

c) Numa solução do composto do Exemplo 13(b) (8,0 g, 19,6 mmol) em CHCl₃:MeOH 4:1, a -78°C, foi introduzido ozono até que uma cor azul persistisse. A solução foi então purgada com argon durante alguns minutos, seguida pela adição de sulfeto de dimetilo (6 ml). A mistura resultante foi agitada durante 2 h à temperatura ambiente e, em seguida, evaporada. O resíduo oleoso foi dissolvido em acetona (175 ml) e arrefecido até 0°C. Foi adicionado reagente de Jones (12 ml de uma solução 2 M), gota a gota e a mistura foi agitada durante 10 minutos antes de ser rapidamente arrefecida com isopropanol. A solução foi vertida em H₂O e extraída, três vezes, com CH₂Cl₂. Os extractos orgânicos combinados foram secos (MgSO₄), filtrados e evaporados sob pressão reduzida. O resíduo oleoso foi purificado por cromatografia de coluna utilizando gel de sílica, eluindo, primeiro com acetato de etilo:hexano 2:3, seguido por ácido acético:acetato de etilo:hexano 5:35:60, originando o composto do título como um sólido castanho-amarelado (3,39 g, rendimento de 40%).

RMN (CDCl₃): δ 7,40 (5H, m); 7,0 (4H, dd);
RMN (CD₃OD): δ 5,05 (1H, obsc.); 5,03 (2H, s); 4,52 (1H, quarte to); 3,2-2,5 (7H, m); 1,40 (9H, s).

Exemplo 14

Preparação de ácido (3R,4S)-4-(N-benziloxicarbonil)amino-2,2-difluoro-3-hidroxi-5-fenilpentanóico

(3R,4S)-4-(N-benziloxicarbonil)amino-2,2-difluoro-3-hidroxi-5-fenilpentanoato de etilo

a) Uma solução de N-Cbz-L-fenil-alanol (0,77 g, 2,75 mmol) em 10 ml de CH_2Cl_2 seco foi adicionada a uma solução do periodinano de Dess-Martin (1,28 g, 3,02 mmol) em 15 ml de CH_2Cl_2 seco, num fluxo uniforme e lento. Após agitação durante 30 min., foram introduzidos 100 ml de uma solução de 1 parte de tiosulfato de sódio aquoso a 10% e 1 parte de NaHCO_3 aquoso saturado, e a mistura foi agitada vigorosamente durante 30 min. A mistura foi extraída, três vezes, com CH_2Cl_2 e os extractos orgânicos combinados foram secos sobre MgSO_4 , filtrados e concentrados in vacuo, originando N-Cbz-L-fenilalanal como um sólido amarelo. Uma suspensão de zinco (0,54 g, 8,24 mmol) e CuBr (60 mg, 0,22 mmol) em 15 ml de THF seco foi tratada com cloreto de dietilalumínio (6,04 ml, 6,04 mmol, 1 M em hexano) e arrefecida até -20°C . A esta suspensão foi adicionada uma solução do N-Cbz-L-fenilalanal em bruto e de bromodifluoroacetato de etilo em 25 ml de THF seco, gota a gota, durante 20 min. A mistura reaccional foi agitada durante 45 min., em seguida foi rapidamente arrefecida pela adição de HCl aquoso a 5% e deixada aquecer até à temperatura ambiente. A mistura foi extraída, três vezes, com Et_2O , e os extractos orgânicos combinados foram secos sobre MgSO_4 , filtrados, e concentrados. A cromatografia flash sobre gel de sílica (Et_2O :hexano 1,5:1) produziu 0,78 g (70%) de uma mistura de diastereómeros de 3:2. Os diastereómeros foram separados por cromatografias flash repetidas (hexano: Et_2O 1:1) fornecendo 468 mg (42%) do composto do título como um sólido branco.

RMN (CDCl_3): δ 7,27 (10H, m); 5,02 (3H, m); 4,31 (2H, q; $J=7,5$ Hz); 4,23 (1H, m); 4,09 (1H, m); 3,86 (1H, br d; $J=6,2$ Hz); 3,01 (2H, m); 1,31 (1H, t, $J=7,5$ Hz).

-69-

ácido (3R,4S)-4-(N-benziloxicarbonil)amino-2,2-difluoro-3-hidroxi-
-5-fenilpentanóico

b) O éster do Exemplo 14(a) (1,0 g, 2,45 mmol) foi dissolvido em 40 ml de MeOH:THF 3:2. Esta solução foi adicionada a K_2CO_3 (2,7 g, 19,6 mmol) em água (25 ml), e a mistura foi agitada vigorosamente durante 3 horas. A solução aquosa foi lavada com Et_2O (rejeitado), acidificada com HCl e extraída, uma vez, com Et_2O , e, duas vezes, com CH_2Cl_2 . Os extractos orgânicos combinados foram secos sobre $MgSO_4$ e filtrados. A evaporação do solvente in vacuo forneceu o ácido do título (0,93 g, 90%) como um sólido branco.

RMN ($CDCl_3$): δ 7,21 (10H, m); 4,91 (3H, m); 4,22 (3H, m); 2,97 (2H, m)

MS: m/z 380

Exemplo 15

Preparação de 2-(acetilserilglutaminilasparaquinil)amino-3-fenil-
-propil-prolilvalilvalinamida

O composto do Exemplo 2(d) (0,35 g, 1,0 mmol) foi ligado a Val-Val-BHA (1,0 mmol) utilizando DCC (0,21 g, 1,0 mmol) e HOBT (0,15 g, 1 mmol) em CH_2Cl_2 a 50%/DMF, durante toda a noite. A resina-peptídilo foi acetilada com Ac_2O (1 ml em 30 ml de CH_2Cl_2) até que o teste da ninhidrina fosse negativo. O péptido foi então completado e acetilado, de acordo com o processo do Exemplo 1, utilizando metade da resina. O intermediário resina-peptídilo foi clivado com 10 ml de HF anidro e com 1 ml de anisol, durante 1 h a 0°C. O péptido foi extraído da resina com HOAc glacial. A liofilização forneceu 150 mg do péptido em bruto (37%). O péptido foi purificado por distribuição em contracorrente (n-butanol:ácido acético:água 4:1:5) produzindo 60 mg. O péptido foi adicionalmente purificado por HPLC preparativa, k' 4,00 (coluna de HPLC semi-preparativa Hamilton PRP-1 305 x 7 mm, água-acetonitrilo-TFA a 0,1%, 95:5 a 78:22 em 13 min, 78:22 a 60:40 em 6,5 min) originando 17,9 mg.

TLC: R_f 0,34 (B:A:W 4:1:1), 0,68 (B:E:A:W 1:1:1:1).

HPLC: (coluna de HPLC analítica Hamilton PRP-1 250 X 4,1 mm, água-acetonitrilo - TFA a 0,1%, 95:5 a 60:40 durante 15 min.) k' 2,73.

FAB-MS: m/z 817 $(M+H)^+$.

Análise de aminoácidos: Ser 0,57, Gln 1,00, Asn 1,00, Val 2,00.

A execução da mesma sequência, excepto substituindo por 1,1 equivalentes molares de cloreto de butirilo o anidrido acético, produziu 2-(butiril-serilglutaminilasparaginil)amino-3-fenil-propil-prolilvalil valinamida.

Exemplo 16

Preparação de 2-(serilglutaminilasparaginil)amino-3-fenilpropil-prolilvalil valinamida

O composto do Exemplo 2(d) (0,87 g, 2,5 mmol) foi ligado a Val-Val-BHA (1,2 mmol) com DCC (0,52 g, 2,5 mmol) e HOBt (0,38 g, 2,5 mmol) em 30 ml de CH_2Cl_2 a 50%/DMF, durante toda a noite. O teste da ninhidrina mostrou ligação completa. O péptido foi completado utilizando 0,6 g (0,4 mmol) da resina. O péptido foi clivado da resina utilizando 15 ml de HF com 1,5 ml de anisol a 0°C durante 1 h. A mistura resina-peptidilo foi lavada com éter (3x) seguido por HOAc (4x). A liofilização do HOAc originou 192,5 mg do péptido em bruto (62%). Uma fracção de 100 mg do péptido em bruto foi purificada por filtração em gel através de Sephadex^R G-15 utilizando HOAc a 1%. Isto forneceu 33,3 mg de péptido, o qual foi adicionalmente purificado por HPLC preparativa (coluna de HPLC semi-preparativa Hamilton PRP 305 x 7 mm, água-acetonitrilo-TFA a 0,1%, 85:15 a 60:40 em 15 min) originando 8,10 mg.

R_f 0,93 (B:A:W 4:1:1), 0,97 (B:E:A:W 1:1:1:1).

HPLC: (coluna de HPLC analítica Hamilton PRP-1 250 X 4,1 mm, água-acetonitrilo - TFA a 0,1%, 95:5 a 60:40 durante 15 min.) k' 2,87

FAB-MS m/z 775 $(M+H)^+$

-71-

Exemplo 17Preparação de 4-(acetilserilglutaminilasparaginil)amino-3(RS)-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentilprolilvalil valinamida

O intermediário suportado pela resina, Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn[3(RS)-AHPPA]-Pro-Val-Val-BHA, foi preparado numa escala de 1 mm da forma usual, de acordo com o Exemplo 1. O Boc-AHPPA utilizado era racémico na posição 3. O péptido foi clivado da resina, e o grupo benzilo foi removido do hidroxilo da serina por tratamento, a 0°C, com 10 ml de HF anidro e 1 ml de anisol, durante 60 min. O HF foi removido in vacuo a 0°C. O resíduo foi triturado com éter dietílico, o péptido foi extraído com ácido acético (3 x 20 ml) e liofilizado, originando 302 mg. A purificação foi efectuada por distribuição em contracorrente (n-butanol:ácido acético:água 4:1:5; 200 transferências). As fracções principais foram reunidas, concentradas, diluídas com ácido acético e liofilizadas, produzindo 103 mg do composto do título.

TLC: (B:E:A:W, 1:1:1:1) $R_f=0,51$;FAB-MS: m/z 875 $(M+H)^+$;

Análise de aminoácidos: Asp=1,00, Ser=0,14, Glu=0,94, Pro=1,09, Val=2,24, conteúdo em péptido (baseado em Asp)=80,8%.

Exemplo 18Preparação de 4-(acetilserilglutaminilasparaginil)amino-3(RS)-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentil-valil valinamida

O intermediário suportado pela resina Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn[3(RS)-AHPPA]-Val-Val-NH₂, foi preparado da forma usual numa escala de 0,5 mmol. O Boc-AHPPA utilizado era racémico na posição 3. O péptido foi clivado da resina com HF anidro (10 ml) em presença de anisol (1 ml), a 0°C durante 60 minutos. Após remoção do HF a 0°C sob vácuo, a resina foi triturada com éter dietílico e seca ao ar. O péptido foi extraído da resina com ácido acético (4 x 20 ml), e liofilizado, originando 110 mg. O péptido foi purificado utilizando distribuição em contracorrente (B:A:W 4:1:5; 200 transferências). As fracções principais foram reunidas, concentradas, diluídas com ácido acético e liofilizadas, produzindo 21 mg

do composto do título.

TLC: (B:E:A:W, 1:1:1:1) $R_f=0,53$

HPLC: (4,5 mm X 25 cm Altex Ultrasphere 5 m ODS, acetonitrilo-água-TFA a 0,1%, gradiente de 10-50% de acetonitrilo durante 20 min.), $k' = 4,47, 4,37$

FAB-MS: m/z 778 $(M+H)^+$;

Análise de aminoácidos: Asp=1,00, Ser=0,71, Glu=1,00, Val=2,09;
Conteúdo em péptidos (baseado em Asp)=72,75%.

Exemplo 19

Preparação de 4-(serilglutaminilasparaquinil)amino-3(R)-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentil-valil valinamida

O intermediário suportado pela resina, Boc-Ser(Bzl)-Gln-Asn[3(R)-AHPPA]-Val-Val-BHA, foi preparado da forma usual numa escala de 1 mmol. Omitindo o passo de acetilação, o péptido foi clivado da resina com remoção do grupo protector benzilo por tratamento com HF (10 ml) e anisol (1 ml), a 0°C durante 60 min. O HF foi removido sob vácuo a 0°C. O resíduo foi triturado com éter dietílico e o péptido foi extraído do resíduo com ácido acético (4 x 10 ml). O extracto do ácido acético foi liofilizado produzindo 85 mg. 40 mg do péptido em bruto foram purificados por HPLC preparativa (Ultrasphere ODS, 15% de acetonitrilo/H₂O-TFA a 0,1%). As fracções contendo o produto desejado foram combinadas, concentradas in vacuo, diluídas com ácido acético e liofilizadas originando 20 mg do péptido do título.

HPLC: (4,6 X 25 cm Altex Ultrasphere ODS, 15% de acetonitrilo-água-TFA a 0,1%) $k'=6,33$.

FAB MS: m/z 736 $(M+H)^+$

Análise de aminoácidos: Asp 1,00, Ser 0,71, Glu 0,99, Val 1,96

Exemplo 20

Preparação de 4-(serilglutaminilasparaquinil)amino-3(S)-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentil-valil valinamida

O intermediário do péptido suportado pela resina, Boc-Ser-(Bzl)-Gln-Asn[3(S)-AHPPA]-Val-Val-NH₂ foi preparado da maneira

usual numa escala de 1 mm. O péptido foi clivado da resina, desblo-
queado e purificado da mesma forma que no Exemplo 19, produzindo
12 mg do composto do título.

HPLC (4,6 mm X 25 cm Altex Ultrasphere ODS, 15% de acetonitrilo-
-água-TFA a 0,1%): $k' = 6,33$

FAB MS: m/z 736 (M+H)⁺

Análise de aminoácidos: Asp 1,00, Ser 0,71, Glu 0,99, Val 1,96

Exemplo 21

Preparação de éster de metilo de (1R,2R)-2-(((2S)-2-(terc-butilo-
xicarbonilserilalanilalanil)amino-1-oxo-3-fenil)propil)ciclopen-
tilcarbonil-valil valina

Éster de metilo de (1R,2R)-2-(((2S)-2-terc-butiloxicarbonilamino-
-1-oxo-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonil-valil valina

a) A uma solução do composto do Exemplo 3(f) (10,5 mg, 29,0 μ mol) em THF (0,4 ml), sob árgon a -40°C, foram adicionados N-metilmorfolina (6 ml, 55 μ mol) e cloroformato de isobutirilo (3,8 ml, 29,1 μ mol). Após 20 min., mais N-metilmorfolina (6 ml) foi adicionada, seguida por uma solução de cloridrato de éster de metilo de valil valina (16 mg, 60 μ mol) em THF (0,5 ml). A mistura foi agitada a -40°C durante 30 min., em seguida 20°C durante 17 horas. A mistura foi diluída com acetato de etilo, lavada com HCl a 5%, seca sobre MgSO₄ e concentrada. A cromatografia flash (CHCl₃:CH₃OH 50:1) forneceu o composto do título como um sólido branco (13,4 mg, 23 μ mol; rendimento de 81%).

TLC: (CHCl₃:CH₃OH 50:1) $R_f = 0,28$.

RMN (CDCl₃): δ 7,26 (3H, m; aromático), 7,10 (2H, m, aromático), 6,50 (1H, d; $J = 8,7$ Hz; NH), 6,35 (1H, d; $J = 8,6$ Hz; NH), 5,11 (1H, d; $J = 7,9$ Hz; BocNH), 4,70 (1H, quarteto aparente), 4,52 (1H, dd; $J = 8,7, 4,9$ Hz), 4,26 (1H, dd; $J = 8,6, 7,1$ Hz), 3,73 (3H, s), 3,51 (1H, quarteto aparente), 3,16 (1H, dd; $J = 14,1, 5,5$ Hz; benzílico), 3,07 (1H, quarteto aparente), 2,86 (1H, dd; $J = 14,1, 6,7$ Hz; benzílico), 2,25-1,60 (8H, m), 1,38 (9H, s), 0,941-0,874 (12H, dupletos em sobreposição).

MS (FAB + VE): m/z 574 (M + H)⁺, 518, 474, 443, 387, 343, 244, 229.

-74-

Éster de metilo (1R,2R)-2-(((2S)-2-amino-1-oxo-3-fenil)propil)-ciclopentilcarbonil-valil valina, sal de ácido trifluoroacético

b) O composto do Exemplo 21(a) (13 mg, 23 mmol) foi dissolvido em ácido trifluoroacético (0,5 ml). Após 2 horas, a solução foi concentrada sob vácuo, e o resíduo foi combinado com cloroto de metileno e reconcentrado, originando o composto do título (13 mg) como um sólido branco.

Éster de metilo de (1R,2R)-2-(((2S)-2-(terc-butiloxycarbonil-(O-fenilmetil)serilalanilalanil)amino-1-oxo-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonil-valil valina

c) A uma solução de Boc-Ser(Bzl)-Ala-Ala (15,1 mg, 34,5 mmol) em THF, a -40°C sob argon, foram adicionado N-metilmorfolina (7,7 ml) e cloroformato de isobutilo (4,5 ml, 35 mmol). Após agitação durante 20 min., foi adicionada mais N-metilmorfolina (7,7 ml), seguida por uma solução do tripéptido do Exemplo 21(b) (13 mg) em THF. A mistura foi aquecida até 20°C e agitada toda a noite. A mistura reaccional foi diluída com CH₂Cl₂, e lavada com HCl a 5%, NaHCO₃ a 5% e água. A evaporação do solvente forneceu um produto em bruto que foi purificado por cromatografia flash (gradiente de eluição, CHCl₃:CH₃OH 50:1 a 25:1), originando o produto do título (17,9 mg, 20 mmol) como um sólido branco.

TLC: (CHCl₃:CH₃OH 95:5) R_f=0,35.

RMN (CD₃OD:CDCl₃ 1:1): δ 7,35 - 7,20 (5H, m), 4,80 (1H, dd; J=8,7, 4,8 Hz), 4,54 (2H, s; PhCH₂O), 4,42-4,16 (5H, m), 3,73 (3H, s), 3,78-3,62 (2H, m; BnOCH₂), 3,40 (1H, m), 3,20 (1H, dd; J=14,4, 4,7 Hz; benzílico), 3,09 (1H, m), 2,92 (1H, dd; J=14,4, 8,7 Hz; Benzílico), 2,25-1,95 (4H, m), 1,85-1,65 (4H, m), 1,47 (9H, s), 1,35 (3H, d; J=7,2 Hz), 1,23 (3H, d; J=7,2 Hz), 0,956-0,922 (12H, dupletos em sobreposição).

MS(FAB + VE): m/z 893 (M + H)⁺, 793, 762, 706, 662, 645, 634, 514, 474, 420, 364.

Éster de metilo de (1R,2R)-2-(((2S)-2-(terc-butiloxycarbonilserilalanilalanil)amino-1-oxo-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonil-valil valina

-75-

d) Uma solução do hexapéptido do Exemplo 21(c) (8,1 mg, 9,1 mmol) em metanol (4 ml) foi agitada com Pd a 10%/C (7 mg), sob uma atmosfera de H₂, durante 15 horas. A filtração e a evaporação forneceram o composto do título (7,2 mg, 9 mmol) como um sólido branco.

TLC (CHCl₃:CH₃OH 95:5): R_f=0,15.

RMN (CD₃OD:CDCl₃ 1:1): δ 7,21 (5H, m), 4,80 (1H, m), 4,36-4,12 (5H, m), 3,81 (1H, dd; J=10,9, 5,3 Hz; CH₂OH), 3,72 (3H, s), 3,67 (1H, dd; J=10,9, 5,8 Hz; CH₂OH), 3,41 (1H, m), 3,20 (1H, dd; J=14,3, 4,6 Hz; Benzílico), 3,07 (1H, m), 2,88 (1H, dd; J=14,3, 9,0 Hz; benzílico), 2,22-1,96 (4H, m), 1,81-1,67 (4H, m), 1,47 (9H, s), 1,38 (3H, d; J=7,3 Hz), 1,27 (3H, d; J=7,3 Hz), 0,960-0,932 (12 H, supletos em sobreposição).

MS (FAB + VE): m/z 803 (M + H)⁺, 787, 703, 672, 616, 572, 544, 473, 330, 315, 298, 274, 244, 203.

MS (FAB - VE): m/z 802, 698, 307, 273, 241, 201, 185, 153.

Exemplo 22

Preparação de éster de metilo de (1R,2R)-2-(((2S)-2-(serilalanil-alanil)amino-1-oxo-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonil-valil valina, cloridrato

O composto do Exemplo 21(d) (5 mg, 6,2 mmol) foi dissolvido em ácido trifluoroacético (0,25 ml). Após 90 min., a solução foi concentrada sob vácuo, o resíduo foi dissolvido em metanol (0,5 ml) e foi adicionado HCl concentrado (cerca de 0,025 ml). A solução foi concentrada, sendo a goma resultante triturada com éter e seca sob vácuo, fornecendo o composto do título (4,5 mg) como um sólido branco.

RMN (CD₃OD): δ 7,20 (5H, m), 4,72 (1H, dd; J=8,5, 5,0 Hz), 4,38 (1H, m), 4,31 (2H, m), 4,19 (1H, d), 3,92 (3H, m), 3,70 (3H, s), 3,48 (1H, m), 3,19 (1H, dd; J=14,3, 5,0 Hz; benzílico), 3,08 (1H, m), 2,83 (1H, dd; J=14,3, 8,5 Hz; benzílico), 2,21-1,98 (4H, m), 1,84-1,65 (4H, m), 1,35 (3H, d; J=7,2 Hz), 1,29 (3H, d; J=7,1 Hz), 0,958-0,921 (12H, dupletos em sobreposição). MS (FAB + VE): m/z 703 (M + H)⁺.

-76-

Exemplo 23

Preparação de éster de metilo de (1S,2S)-2-(((1S,2S)-2-(terc-butiloxicarbonilserilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)-ciclopentilcarbonil-valil valina

Éster de metilo de (1S,2S)-2-(((1R,2S)-2-terc-butiloxicarbonil-amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentanocarbonil-L-valil-L-valina

a) O produto do Exemplo 8 (35,5 mg, 97,8 mmol) e HOBT (26 mg, 196 mmol) foram dissolvidos em dioxano (0,5 ml) e DMF (0,1 ml), e, em seguida, foi adicionado DCC (20,2 mg, 98,1 mmol). Após 20 min. de agitação, foram adicionados N-metilmorfolina (32 ml, 290 mmol) e cloridrato de éster de metilo de valil valina (52 mg, 195 mmol). Após 3 dias, a mistura foi diluída com acetato de etilo, filtrada e extraída com HCl diluído. A camada orgânica foi concentrada. A cromatografia flash ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 50:1) do produto em bruto forneceu o isômero A (26 mg, 45,9 mmol; rendimento de 47%) que eluiu primeiro e o isômero B (25 mg, 43,1 mmol; rendimento de 44%).

isômero A:

éster de metilo de (1S,2S)-2-(((1R,2S)-2-(terc-butiloxicarbonil)-amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentanocarbonil-valil valina
TLC: ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 25:1) $R_f=0,55$.

RMN (CDCl_3): δ 7,28 (5H, m), 6,73 (1H, d; $J=8,7$ Hz; NH), 6,42 (1H, d; $J=8,6$ Hz; NH), 5,16 (1H, d; $J=9,5$ Hz; BocNH), 4,58 (1H, dd; $J=8,8, 5,2$ Hz), 4,32 (1H, dd; $J=8,6, 6,0$ Hz), 3,91 (1H, quarteto aparente), 3,76 (3H, s), 3,25 (1H, duplete aparente; $J=10,2$ Hz), 2,95-2,83 (2H; benzílico), 2,52 (1H, quarteto aparente), 2,30-2,10 (3H, m), 2,00-1,55 (6H, m), 1,39 (9H, s), 0,990-0,907 (12H, quarteto aparente).

MS(FAB + VE): m/z 576 ($M + H$)⁺, 476, 389, 345, 317, 246, 225.

isômero B:

éster de metilo de (1S,2S)-2-(((1S,2S)-2-(terc-butiloxicarbonil)-amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentanocarbonil-valil valina

TLC: ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 25:1) $R_f=0,45$.

-77-

RMN (CDCl_3): δ 7,24-7,15 (5H, m), 6,77 (1H, d; $J=8,3$ Hz), 6,56 (1H, d; $J=8,2$ Hz), 4,80 (1H, d; $J=8,4$ Hz), 4,47 (1H, dd; $J=8,4$, 4,9 Hz), 4,36 (1H, tripleto aparente), 3,80-3,60 (5H, m), 3,08 (1H, dd), 2,69 (2H, m; benzílico), 2,53 (1H, m), 2,25-2,05 (2H, m), 2,00-1,60 (6H, m), 1,32 (9H, s), 0,979-0,855 (12H, dupletos em sobreposição).

MS(FAB + VE): m/z 576 ($M + H$)⁺, 476, 389, 246, 231, 152, 132.

Éster de metilo de (1S,2S)-2-(((1S,2S)-2-amino-1-hidroxi-3-fenil)-propil)ciclopentanocarbonil-valil valina, cloridrato

b) O isômero B do Exemplo 23(a) (25 mg, 43 mmol) foi dissolvido em ácido trifluoroacético (0,25 ml). Após 1 hora, a solução foi concentrada por evaporação rotatória. O resíduo foi dissolvido em CH_3OH , tratado com HCl concentrado (0,05 ml) e re-concentrado. A trituração com Et_2O e secagem sob vácuo forneceram o composto do título como um pó branco (22 mg, 43 mmol).

Éster de metilo de (1S,2S)-2-(((1R,2S)-2-amino-1-hidroxi-3-fenil)-propil)ciclopentanocarbonil-valil valina, cloridrato

c) O isômero A do Exemplo 23(a) (26 mg, 45 mmol) foi tratado com ácido trifluoroacético e HCl de acordo com o processo do Exemplo 23(b), fornecendo o composto do título (19,9 mg, 39 mmol).

Éster de metilo de (1S,2S)-2-(((1S,2S)-2-(terc-butiloxicarbonil-L-(O-fenilmetil)serilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonil-valil valina

d) A uma solução de Boc-Ser(Bzl)-Ala-Ala (19,4 mg, 44,4 mmol) em THF (0,5 ml), a -40°C sob argon, foram adicionados N-metilmorfolino (8,8 ml) e cloroformato de isobutilo (5,8 ml, 44,4 mmol). Após agitação durante 20 min., foi adicionada mais N-metilmorfolina (8,8 ml), seguida por uma solução do composto do Exemplo 23(b) (22 mg, 43 mmol) em THF (1,0 ml). A mistura foi aquecida até 20°C e agitada durante toda a noite. A mistura reacional foi diluída com CH_2Cl_2 e lavada com HCl a 5%, seca (MgSO_4) e concentrada. A cromatografia flash do resíduo forneceu o composto do título como um sólido branco (25 mg, 28 mmol; Rendimento de 65%).

-78-

RMN (CDCl_3): δ 7,40-7,05 (11H, m), 7,00-6,80 (4H, m; NH), 5,53 (1H, d; BocNH), 4,52 (2H, s), 4,47-4,30 (4H, m), 4,19-4,06 (2H, m), 3,97 (1H, largo), 3,80-3,62 (2H, m), 3,69 (3H, s), 3,07 (1H, dd), 2,83 (1H, dd), 2,66 (1H, m), 2,52 (1H, m), 2,34 (1H, largo), 2,23-2,03 (2H, m), 2,00-1,84 (2H, m), 1,80-1,60 (4H, m), 1,46 (9H, s), 1,32 (3H, d; $J=7,0$ Hz), 1,15 (3H, d; $J=7,1$ Hz), 0,939 (6H, dois dupletos em sobreposição), 0,871 (6H, dois dupletos em sobreposição).

MS (FAB + VE): m/z 895 ($M + H$)⁺, 795 ($M - \text{Boc} + H$)⁺, 764, 708, 664, 618, 565, 547, 476, 416, 388.

Éster de metilo de (1S,2S)-2-(((1R,2S)-2-(terc-butiloxicarbonil-L-(O-fenilmetil)serilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonil-valil valina

e) Por um processo substancialmente idêntico ao do Exemplo 23(d), utilizando o tripéptido preparado no Exemplo 25(c) (19,9 mg, 39 mmol), Boc-Ser(Bzl)-Ala-Ala (17,5 mg, 40 mmol), clo-roformato de isobutirilo (5,2 ml, 40 mmol) e N-metilmorfolina (2x8,8 ml), foi obtido o composto do título como um sólido branco (23,2 mg, 26 mmol; rendimento de 67%).

RMN (CDCl_3): δ 7,38-7,17 (10H, m), 7,10 (2H, m; NH), 6,96 (1H, d; $J=8,3$ Hz; NH), 6,87 (1H, d; $J=9,1$ Hz; NH), 6,63 (1H, d; $J=8,4$ Hz; NH), 5,50 (1H, d; $J=6,4$ Hz; BocNH), 4,56 (2H, s; benzílico), 4,53-4,36 (4H, m), 4,39 (2H, m), 4,15 (1H, quarteto aparente), 3,84 (1H, dd; $J=9,4, 4,6$ Hz), 3,74 (3H, s), 3,66 (1H, dd; $J=9,4, 5,8$ Hz), 3,33 (1H, tripleto aparente), 2,94-2,91 (2H, m; benzílico), 2,57 (1H, quarteto aparente), 2,26-2,08 (4H, m), 1,95-1,75 (3H, m), 1,67-1,50 (2H, m), 1,45 (9H, s), 1,37 (3H, d; $J=7,1$ Hz), 1,30 (3H, d; $J=7,1$ Hz), 0,950-0,892 (12H, dupletos em sobreposição).

Éster de metilo de (1S,2S)-2-(((1S,2S)-2-(terc-butiloxicarbonil-L-serilalanilalanil)-amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonil-valil valina

f) Uma solução do composto do Exemplo 23(d) (25 mg, 28 mmol) em metanol (1 ml) foi agitada com Pd a 10%/C (12 mg), sob uma atmosfera de H_2 , durante 15 horas. A filtração e a evapora-

-79-

ção do solvente forneceram o composto do título (20,7 mg, 25,7 mmol; rendimento de 92%) como um sólido branco.

TLC: (CHCl₃:CH₃OH 95:5) R_f=0,39.

RMN (CDCl₃): δ 7,71 (1H, largo; NH), 7,58 (1H, d largo; NH), 7,16 (5H, m), 6,97 (2H, m; NH), 6,12 (1H, largo; NH), 4,75 (1H, largo; BocNH), 4,42 (1H, dd), 4,40-4,04 (5H, m), 3,89 (1H, largo), 3,70 (3H, s), 3,64 (2H, m), 3,03 (1H, dd), 2,82-2,44 (4H, m), 2,23-1,87 (4H, m), 1,80-1,60 (4H, m), 1,45 (9H, s), 1,35 (3H, d; J=6,8 Hz), 1,09 (3H, d; J=6,9 Hz), 0,963 (6H; dois dupletos), 0,853 (6H, dois dupletos).

MS (FAB + VE): m/z 805 (M + H)⁺, 789, 705, 674, 618, 574, 476, 416, 388, 300.

MS (FAB-VE): m/z 803 (M-H)⁻.

Exemplo 24

Preparação de éster de metilo de (1S,2S)-2-(((1S,2S)-2-(L-seril-L-alanil-L-alanil)-amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonilvalil valina, sal de ácido trifluoroacético

O produto do Exemplo 23(f) (1,3 mg, 1,6 mmol) foi dissolvido em ácido trifluoroacético. Após 90 min., a solução foi concentrada até à secura sob vácuo. O resíduo foi triturado com éter e o éter foi removido sob vácuo, produzindo o hexapéptido do título como um sólido branco.

Exemplo 25

Preparação de éster de metilo de (1S,2S)-2-(((1R,2S)-2-(terc-butiloxicarbonilserilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)-ciclopentilcarbonil-L-valil-L-valina

Utilizando o processo do Exemplo 23(f), o hexapéptido do Exemplo 23(e) (23 mg, 26 mmol) foi desbenzilado para originar o composto do título, como um sólido branco (18,9 mg, 23,5 mmol; rendimento de 90%).

TLC: (CHCl₃:CH₃OH 95:5) R_f=0,45.

RMN (CDCl₃): δ 7,47 (1H, d; J=7,3 Hz; NH), 7,34 (1H, d; J=6,8 Hz; NH), 7,29-7,16 (5H, m), 7,09 (1H, d; J=8,9 Hz, NH), 6,79

-80-

(1H, d; J=8,5 Hz; NH), 5,79 (1H, d; J=6,5 Hz; NH), 4,76 (1H, largo), 4,45-4,20 (5H, m), 4,11 (1H, quarteto aparente), 3,94 (1H, dd; J=10,9, 4,3 Hz), 3,74 (3H, s), 3,66 (1H, dd), 3,31 (1H, duplete largo), 2,91 (2H, duplete aparente), 2,58 (1H, quarteto aparente), 2,44 (2H, largo), 2,28-2,08 (3H, m), 1,95-1,71 (3H, m), 1,59 (2H, m), 1,45 (9H, s), 1,41 (3H, d; J=7,1 Hz), 1,30 (3H, d; J=7,1 Hz), 0,951-0,906 (12H, m).

MS (FAB + VE): m/z 805 (M + H)⁺, 787, 731, 705, 674, 618, 547, 519, 476.

MS (FAB-VE): m/z 803, 711, 699.

Exemplo 26

Preparação de éster de metilo de (1S,2S)-2-(((1R,2S)-2-(serilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonil-valil valina, sal de ácido trifluoroacético

O composto do Exemplo 25 (1,2 mg, 1,5 mmol) foi dissolvido em ácido trifluoroacético. Após 90 min., a solução foi concentrada até à secura, sob vácuo. O resíduo foi triturado com éter, originando um sólido branco.

Exemplo 27

Preparação de éster de metilo de (1R,2R)-2-(((1S,2S)-2-(terc-butiloxi-carbonilserilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)-ciclopentilcarbonil-valil valina

(1R,2R)-2-(((1R,2S)-1-hidroxi-2-terc-butiloxycarbonilamino-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonil-valil valina

a) A uma solução dos epímeros do Exemplo 5 (36 mg, 0,10 mmol) em dioxano (0,4 ml) foram adicionados N-hidroxibenzotriazol (27 mg, 0,20 mmol) e DCC (22 mg, 0,11 mmol). Após 20 min. de agitação, foi adicionada N-metilmorfolina (27 ml, 0,25 mmol), seguida por cloridrato de éster de metilo de valil valina (53 mg, 0,20 mmol). A mistura foi agitada durante 5 dias, sendo, em seguida, filtrada e concentrada. A cromatografia flash (CHCl₃:CH₃OH 25:1) forneceu os compostos epiméricos do título, com rendimento de 89%, como uma espuma branca (51 mg, 0,089 mmol).

-81-

TLC (CHCl₃:CH₃OH 20:1): R_f=0,37.RMN (CDCl₃): δ 7,35-7,15 (5H, m), 7,05-6,75 (2H, m; NH), 5,13 (1H, m; BocNH), 4,50 (1H, m), 4,30 (1H, m), 3,85-3,60 (5H, m), 2,95-2,58 (3H, m), 2,43-1,55 (8H, m), 1,45-1,25 (9H, dois singuletos; Boc), 1,05-0,90 (12H, m).MS(FAB⁺): m/z 576 (M+H)⁺, 476 (M-OCOC(CH₃)₃)⁺.Éster de metilo de (1R,2R)-2-(((1R,2S)-1-hidroxi-2-amino-3-fenil)-propil)ciclopentilcarbonil-valil valina, cloridrato

b) Os péptidos do Exemplo 27(a) (48 mg, 83 mmol) foram dissolvidos em ácido trifluoroacético (0,5 ml). Após 1 hora, a solução foi concentrada por evaporação rotatória, e o resíduo foi dissolvido em CH₃OH, tratado com HCl concentrado (0,1 ml) e re-concentrado. A trituração com éter e a secagem sob vácuo, forneceram os compostos do título epiméricos, como um pó branco (42 mg, 82 mmol).

Éster de metilo de (1R,2R)-2-(((1R,2S)-2-(terc-butiloxicarbonil-(0-fenilmetil)-serilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)-ciclopentil-carbonil-valil valina

c) A uma solução de Boc-Ser(Bzl)-Ala-Ala (35 mg, 0,080 mmol) em THF (0,4 ml), a -40°C sob argon, foram adicionados N-metil morfolina (11 ml, 0,10 mmol) e cloroformato de isobutirilo (10,4 ml, 0,080 mmol). Após 20 minutos de agitação, foi adicionada N-metilmorfolina (11 ml), seguida por uma solução dos compostos do Exemplo 27(b) (42 mg, 0,082 mmol) em THF (1 ml). A mistura foi agitada com aquecimento até 20°C durante toda a noite, em seguida foi dissolvida em CH₂Cl₂ e lavada com HCl a 5%, NaHCO₃ a 5% e água. A evaporação do solvente forneceu 61 mg de um produto em bruto. Uma fracção de 50 mg do produto em bruto foi purificada por cromatografia flash (gradiente de eluição, CHCl₃:CH₃OH 50:1 a 25:1), eluindo o isômero A puro (16 mg), seguido por uma fracção mista (11 mg), e finalmente o isômero B puro (13 mg).

isômero B:Éster de metilo de (1R,2R)-2-(((1S,2S)-2-(terc-butiloxicarbonil-L-(0-fenilmetil)serilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonil-valil valina

-82-

TLC: (CHCl₃:CH₃OH 25:1) R_F=0,40.

RMN (CDCl₃): δ 7,40-6,95 (15H, m; arilo + NH), 5,58 (1H, d; BocNH), 4,53 (2H, s; benzílico), 4,51 (1H, dd), 4,37 (2H, m), 4,26-4,20 (3H, m), 3,75 (2H, m), 3,71 (3H, s), 3,54 (1H, largo), 2,96-2,90 (2H; benzílico), 2,69 (1H, m), 2,38 (1H, m), 2,15 (2H, m; CH(CH₃)₂), 1,90-1,60 (6H, m), 1,46 (9H, s; Boc), 1,37 (3H, d; J=7,2 Hz; CH₃), 1,20 (3H, d; J=7,2 Hz; CH₃), 0,937 - 0,980 (12H, dupletos em sobreposição; CH₃).

isômero A

éster de metilo de (1R,2R)-2-(((1R,2S)-2-(terc-butiloxicarbonil-L-(O-fenilmetil)serilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonil-valil valina

TLC: CHCl₃:CH₃OH 25:1) R_F=0,45

RMN (CDCl₃): δ 7,79 (14H, d; NH), 7,40-7,10 (11H, m; arilo + NH), 6,70 (2H; NH), 5,59 (1H, d; J=3,3 Hz; NH), 4,93 (1H, d; J=3,2 Hz), 4,54 (2H, s; benzílico), 4,47 (1H, dd; J=8,5, 5,0 Hz), 4,30-4,20 (4H, m), 4,14 (1H, m), 3,78 (1H, m), 3,71 (3H, s), 3,67 (1H, m), 2,90 (1H, dd; benzílico), 2,77 (2H, m), 2,35-2,10 (4H, m), 1,95-1,55 (6H, m), 1,49 (9H, s; Boc), 1,40 (3H, d; J=7,3 Hz; CH₃), 1,12 (3H, d; J=7,3 Hz; CH₃), 0,99 (6H, dois dupletos; CH₃), 0,91 (6H, dois dupletos; CH₃).

Éster de metilo de (1R,2R)-2-(((1S,2S)-2-(terc-butiloxicarbonil-serilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonilvalil valina

d) Uma solução do isômero B do Exemplo 27 (c) (13 mg, 15 mmol) em metanol (5 ml) foi agitada com Pd a 10%/C (10 mg), sob uma atmosfera de H₂, durante 15 horas. A filtração e a evaporação forneceram o péptido do título (12 mg, 15 mmol), como um sólido branco.

TLC: CHCl₃:CH₃OH 95:5) R_F=0,21.

RMN (CD₃OD): δ 7,21 (5H, m), 4,35 (1H, m), 4,30-4,13 (4H, m), 4,08 (1H, largo), 3,85 (1H, dd; J=10,8, 5,4 Hz) CH₂OH), 3,73 (1H, m), 3,72 (3H, s), 3,58 (1H, t aparente; J=4,3 Hz), 2,92 (1H, dd; J=13,7, 6,2 Hz; benzílico), 2,75 (1H, dd; benzílico), 2,71 (1H, m), 2,37 (1H, m largo), 2,19-2,02 (2H, m; CH(CH₃)₂),

-83-

1,85-1,60 (6H, m), 1,48 (9H, s; Boc), 1,41 (3H, d; $J=7,3$ Hz; CH_3), 1,21 (3H, d; $J=7,3$; CH_3), 0,934-0,928 (12H; dupletos em sobreposição; CH_3).

MS (FAB + VE): m/z 805 ($M + H$)⁺, 674, 618, 574, 476, 309, 274, 246, 228, 203.

Exemplo 28

Preparação de éster de metilo de (1R,2R)-2-(((1S,2S)-2-(seril-alanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonil-valil valina, cloridrato

O produto do Exemplo 27(d) (12 mg, 15 mmol) foi dissolvido em ácido trifluoroacético (0,5 ml). Após 90 min, a solução foi concentrada sob vácuo; o resíduo foi dissolvido em metanol (1 ml) e foi adicionado HCl concentrado (cerca de 0,05 ml). A solução foi concentrada, a goma resultante foi triturada com éter e seca sob vácuo, originando o composto do título (11 mg) como um pó branco.

RMN (CD_3OD): δ 7,23 (5H, m), 4,50-4,25 (3H, m), 4,16 (1H, m), 4,05-3,90 (3H, m), 3,70 (3H, s), 3,51 (1H, dd), 3,00-2,70 (2H, m), 2,56 (1H, m), 2,32 (1H, m), 2,20-1,95 (2H, m), 1,80-1,58 (6H, m), 1,40 (3H, d; $J=7,1$ Hz), 1,27 (3H, d; $J=7,2$ Hz), 0,959-0,931 (12H, dupletos em sobreposição).

MS (FAB + VE): m/z 705 ($M+H$)⁺, 574, 476.

Exemplo 29

Preparação de éster de metilo de (1R,2R)-2-(((1R,2S)-2-(terc-butiloxicarbonilserilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)-ciclopentilcarbonil-valil valina

O isômero A do Exemplo 27(c) (15,5 mg, 17,3 mmol) foi agitado com Pd a 10%/C (10 mg) em metanol (5 ml), sob uma atmosfera de H_2 , durante 15 horas. A filtração e a evaporação forneceram o péptido do título (13,8 mg, 17,2 mmol).

TLC: ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 95:5) $R_f=0,27$.

RMN (CD_3OD): δ 7,22 (5H, m), 4,40 - 4,10 (6H, m), 3,86 (1H, dd;

-84-

$J=11,0, 5,5 \text{ Hz}$; CH_2OH), 3,78 (1H, dd; $J=11,0, 6,0$; CH_2OH), 3,72 (3H, s), 3,58 (1H, dd; $J=10,0, 1,8$), 2,98 (1H, dd; $J=14,1, 3,4 \text{ Hz}$; benzílico), 2,81-2,71 (2H, m), 2,34 (1H, m), 2,24-1,60 (8H, m), 1,50 (9H, s), 1,40 (3H, d; $J=7,3 \text{ Hz}$; CH_3), 1,11 (3H, d; $J=7,4 \text{ Hz}$; CH_3), 1,02-0,940 (12H, quatro dupletos; $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$). MS (FAB + VE): m/z 805 ($M + H$)⁺, 674, 618, 574, 519, 475, 308, 264.

Exemplo 30

Preparação de éster de metilo de (1R,2R)-2-(((1R,2S)-2-(serilalanil-L-alanil)amino-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentil-carbonil-valil valina, cloridrato

Utilizando o processo do Exemplo 28, o hexapéptido do Exemplo 29 (13,8 mg, 17,2 mmol) foi tratado com ácido trifluoroacético e HCl, originando o composto do título (13 mg).

RMN (CD_3OD): δ 7,20 (5H, m), 4,39-4,17 (4H, m), 4,07-3,92 (4H, m), 3,70 (3H, s), 3,52 (1H, dd; $J=9,5, 2,9 \text{ Hz}$), 2,98 (1H, dd; $J=14,2, 3,4 \text{ Hz}$; benzílico), 2,82-2,68 (2H, m), 2,38 (1H, m), 2,21-1,55 (8H, m), 1,35 (3H, d; $J=7,2 \text{ Hz}$), 1,20 (3H, d; $J=7,1 \text{ Hz}$), 1,01-0,889 (12H, quatro dupletos).

MS (FAB + VE): m/z 705 ($M + H$)⁺, 575, 476.

Exemplo 31

Preparação de metil éster de (1R,2R)-2-(((1R,2S)-2-(acetil-serilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonil-valil valina

Metil éster de (1R,2R)-2-(((1R,2S)-2-(acetil-(O-fenilmetil)serilalanil alanil)amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonil-valil valina

a) Uma mistura de 1:1 dos epímeros do composto do Exemplo 27(c) (10,8 mg, 12,2 mmol) foi dissolvida em ácido trifluoroacético (0,5 ml). Após 75 min, a solução foi concentrada sob vácuo. O resíduo foi dissolvido em CH_2Cl_2 e extraído com NaHCO_3 a 5%. A camada do CH_2Cl_2 foi seca sobre MgSO_4 e concentrada até um sólido branco (8,8 mg, TLC: ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 25:1) $R_f=0,13$). O sólido foi

agitado como uma suspensão em CH_2Cl_2 :dioxano 1:1 (2 ml) e anidrido acético (1,1 ml, 12 mmol). Após 30 min., o solvente foi removido por evaporação rotatória. O resíduo foi purificado por cromatografia flash (CHCl_3 : CH_3OH 9:1) fornecendo a mistura epimérica do título como um sólido branco (9,2 mg, 11,0 mmol).

TLC: (CHCl_3 : CH_3OH 25:1) R_f =0,25, 0,18.

RMN (CD_3OD): δ 7,38-7,11 (10H, m), 4,57 (2H, s), 4,53-3,97 (6H, m), 3,78 (2H, tripleto aparente), 3,70 (3H, s), 3,68 (1H, m), 3,53 (1H, m), 3,00-2,59 (2H, m), 2,35 (1H, m), 2,18-1,98 (5H, m), 1,95-1,55 (6H, m), 1,37 (3H; dupletos em sobreposição), 1,17-1,07 (3H, dois dupletos), 0,94 (12H, dupletos em sobreposição).

Éster de metilo de (1R,2R)-2-(((1R,2S)-2-(acetil-serilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenil)propil)ciclopentilcarbonil-valil valina

b) Uma solução dos epímeros do Exemplo 31(a) (9,2 mg, 11,0 mmol) em ácido acético (1 ml) foi agitada com Pd a 10% em carbono (6,0 mg), sob hidrogênio (1 atmosfera) durante 18 horas. A solução foi filtrada e concentrada sob vácuo fornecendo a mistura epimérica do título como um sólido branco (8,2 mg, 11,0 mmol).

TLC: (CHCl_3 : CH_3OH 9:1) R_f =0,35, 0,27.

RMN (CD_3OD): δ 7,21 (5H, m), 4,42-4,09 (6H, m), 3,89-3,60 (2H, m), 3,70 (3H, s), 3,04 (1H, m), 2,99-2,59 (2H, m), 2,34 (1H, m), 2,18-1,99 (5H, m), 1,92-1,55 (6H, m), 1,38 (3H, dupletos em sobreposição), 1,20-1,08 (3H, dois dupletos), 0,93 (12H, dupletos em sobreposição).

MS (FAB + VE): m/z 747 ($M + H$)⁺, 616, 517, 476, 317, 272, 246, 228, 201, 183.

Exemplo 32

Preparação de éster de metilo de trans-2-((1-metoxi-1-(2-fenil-1-((terc-butiloxicarbonil-serilalanilalanil)amino)etil)fosfinil)-ciclopentilcarbonil-valil valina

Éster de metilo de trans-2-((1-metoxi-1-(2-fenil-1-fenilmetoxycarbonilamino)etil)fosfinil)ciclopentilcarbonil-valil valina

a) Foi adicionado cloroformato de isobutilo (13 ml, 0,10 mmol) a uma solução sob agitação do composto do Exemplo 11(d) (45 mg, 0,10 mmol) e N-metilmorfolina (17 ml, 0,15 mmol) em THF a -40°C. Após 30 min, foi adicionada N-metilmorfolina (17 ml, 0,15 mmol), seguida por cloridrato de éster de metilo de valil valina sólido (40 mg, 0,15 mmol). A mistura foi deixada aquecer até 20°C com agitação. Após 14 horas, a mistura foi diluída com HCl a 5% e extraída com CH₂Cl₂. O extracto do CH₂Cl₂ foi concentrado e purificado por cromatografia flash (CHCl₃:CH₃OH 25:1) originando o composto do título como um sólido branco (65 mg, 98,9 mmol), com rendimento de 99%.

TLC: (CHCl₃:CH₃OH 9:1) R_f=0,6.

RMN (CDCl₃): δ 7,33-7,10 (10H, m), 5,08-4,77 (2H, m), 4,70-4,24 (3H, m), 3,82-3,66 (6H, m), 3,41-2,63 (3H, m), 2,24-1,51 (8H, m), 1,03-0,89 (13H, m).

Éster de metilo de trans-2-((1-metoxi-1-(1-amino-2-fenil)etil)-fosfinil)ciclopentilcarbonil-valil valina

b) Uma solução do composto do Exemplo 32(a) (30 mg, 46 mmol) em metanol (1,5 ml) foi agitada com Pd a 10%/C (30 mg), sob hidrogénio (1,013 × 10⁵ Pa) durante 9 horas. A mistura foi filtrada e concentrada sob vácuo originando o composto do título como um vidro (20 mg, 38 mmol; rendimento de 84%).

RMN (CDCl₃): δ 7,38-7,18 (5H, m), 4,51 (1H, m), 4,30 (1H, m), 3,90-3,68 (6H, m), 3,44-3,03 (2H, m), 2,93-2,48 (1H, m), 2,25-1,67 (8H, m), 1,27 (1H, m), 1,01-0,85 (13H, m).

Éster de metilo de trans-2-((1-metoxi-1-(2-fenil-1-(terc-butiloxi-carbonil-(O-fenilmetil)serilalanilalanil)amino)etil)fosfinil)-ciclopentilcarbonilvalil valina

c) Por um processo substancialmente semelhante ao do Exemplo 27(c), utilizando o composto do Exemplo 32(b) (20 mg, 38 mmol), Boc-Ser(Bzl)-Ala-Ala (18,4 mg, 42 mmol), N-metilmorfolina (7,0 ml, 63 mmol) e cloroformato de isobutirilo (5,5 ml, 42 mmol), e cromatografia flash subsequente (CHCl₃:CH₃OH 50:1), foi obtido o composto do título como um vidro (23,5 mg, 24,9 mmol; rendimento de 65%).

TLC: ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 9:1) $R_f=0,5$.

RMN (CDCl_3): δ 7,39-7,13 (10H, m), 4,80-4,20 (8H, m), 3,90-3,60 (8H, m), 3,45-2,70 (3H, m), 2,22-1,64 (8H, m), 1,50-1,25 (12H, m), 1,10 (3H, m), 1,04-0,85 (13H, m).

Éster de metilo de trans-2-((1-metoxi-1-(2-fenil-1-(terc-butilo-xicarbonilserilalanilalanil)amino)etil)fosfinil)ciclopentilcarbonilvalil valina

d) Utilizando o processo do Exemplo 27(d), o composto acima do Exemplo 32(c) (23 mg, 24 mmol) foi hidrogenolizado originando o composto do título (19,1 mg, 22 mmol; rendimento de 93%), como um sólido branco.

RMN (CD_3OD): δ 7,32-7,16 (5H), 4,75-4,10 (6H), 3,87-3,66 (8H), 3,32-2,72 (3H), 2,20-1,62 (8H), 1,50-1,28 (12H), 1,13 (3H), 1,05-0,85 (13H).

MS (FAB + VE): 853 (M + H)⁺, 753.

Exemplo 33

Preparação de bromidrato de éster de metilo de trans-2-((1-hidroxi-1-(2-fenil-1-(serilalanilalanil)amino)etil)fosfinil)ciclopentilcarbonil-valil valina

Brometo de trimetilsililo (4,0 ml, 30 mmol) foi adicionado a uma solução do composto do Exemplo 32(d) (9,6 mg, 11,3 mmol) em CH_2Cl_2 seco (1 ml). Após 4,5 horas, foi adicionada água:ácido acético 1:1 (0,5 ml). A mistura foi concentrada e seca sob vácuo, até um sólido. O resíduo foi dissolvido em metanol (1 ml) e tratado com HBr a 30% em ácido (50 ml), em seguida foi concentrado e seco sob vácuo originando o composto do título (9 mg) como um pó amarelo claro.

RMN (CD_3OD): δ 7,30-7,15 (5H, m), 4,55-3,92 (5H, m), 3,83-3,66 (5H, m), 3,30-2,08 (4H, m), 2,20-1,64 (8H, m), 1,47-1,25 (4H, m), 1,12 (3H, m), 1,05-0,90 (12H, m).

MS (FAB + VE): m/z 739 (M-HBr + H)⁺, 260, 232, 159.

Exemplo 34

Preparação de éster de metilo de (5S,4RS)-5-(terc-butiloxicarbonil-serilalanilalanil)-amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina

Éster de metilo de (5S)-5-(t-butiloxicarbonilamino)-1,4-dioxo-6-fenil-hexil-valil valina

a) A uma solução do composto do Exemplo 12(b) (160 mg, 0,495 mmol) em THF (5 ml) a -40°C sob árgon foi adicionado N-metilmorfolina (66 mg, 0,66 mmol), seguida por cloroformato de isobutilo (68 mg, 0,495 mmol). A mistura reaccional foi agitada durante 15 minutos, em seguida foi adicionada N-metilmorfolina (66 mg, 0,66 mmol), seguida por uma solução de cloridrato de éster de metilo de valil valina (120 mg, 0,45 mmol) em THF (6 ml), gota a gota. A mistura foi agitada a -40°C durante 30 min, em seguida a 20°C durante 17 horas. A mistura reaccional foi então diluída com acetato de etilo:diclorometano 1:1 (100 ml), e lavada sucessivamente com HCl a 5%, bicarbonato de sódio a 5% e cloreto de sódio aquoso saturado. Os extractos orgânicos foram secos (MgSO_4), fechados e evaporados sob pressão reduzida até um óleo. A cromatografia flash sobre gel de sílica (clorofórmio:metanol 25:1) forneceu o composto do título (160 mg; rendimento de 70%) como uma espuma branca.

RMN (CDCl_3): δ 7,25 (5H, m), 6,34 (1H, d), 6,15 (1H, d), 5,24 (1H, d), 4,58 (2H, m), 4,31 (1H, dd), 3,78 (3H, s), 3,19 (1H, m), 2,95 (1H, m), 2,87 (2H, m), 2,52 (2H, t), 2,21 (2H, penteto), 1,43 (9H, s), 0,98 (12H, m).

MS (FAB^+): m/z 534;

MS (FAB^-): m/z 532

Éster de metilo de (5S,4RS)-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina

b) A uma solução do composto do Exemplo 34(a) (160 mg, 3,0 mmol) em metanol a 0°C foi adicionado boro-hidreto de sódio (5,7 mg, $1,5 \times 10^{-4}$ mole) em fracções. Após 20 min, a mistura foi diluída com HCl a 5% e extraída (3x) com diclorometano. Os extractos orgânicos foram secos com MgSO_4 , filtrados e evaporados

-89-

até flocos brancos. A cromatografia flash sobre gel de sílica (clorofórmio:metanol 40:1) produziu o composto do título como flocos brancos (112 mg, 70%).

RMN ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$): δ 7,15 (5H, m); 4,38 (1H, dd); 4,10 (1H, m); 3,63 (3H, s); 3,0 a 1,5 (8H, m); 1,28 (9H, s); 0,88 (12H, m).

Éster de metilo de (5S,4RS)-5-(terc-butiloxicarbonil-(O-fenilmetil)serilalanil-alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina

c) O péptido do Exemplo 34(b) (98 mg, 0,183 mmol) foi dissolvido em ácido trifluoroacético puro (3 ml) e agitado, à temperatura ambiente, durante duas horas. A solução foi então concentrada sob pressão reduzida, dissolvida em metanol, tratada com HCl concentrado (3 gotas) e evaporada sob pressão reduzida originando 68 mg do cloridrato da amina tripeptídica como flocos brancos.

A uma solução de Boc-Ser(OBz)-Ala-Ala (87,4 mg, 0,20 mmol) em THF (5 ml) a -40°C sob argon, foi adicionada N-metil morfolina (25 ml, 0,27 mmol), seguida por cloroformato de isobutilo (27 mg, 0,20 mmol). A mistura foi agitada durante 15 minutos, em seguida foi adicionada N-metilmorfolina (25 ml, 0,27 mmol), seguida pelo cloridrato de 5-amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina (86 mg, 0,18 mmol) em THF (1 ml), gota a gota. A mistura foi agitada a -40°C durante 30 minutos, em seguida a 20°C durante 17 horas. A mistura reaccional foi diluída com acetato de etilo:diclorometano 1:1 (100 ml), e lavada sucessivamente com HCl a 5%, bicarbonato de sódio aquoso a 5%, cloreto de sódio aquoso saturado, e evaporada até um sólido branco. O sólido foi purificado por cromatografia flash sobre gel de sílica (clorofórmio:metanol 20:1) produzindo o hexapéptido do título como cristais brancos (98 mg; rendimento de 63%).

RMN ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): δ 7,1 (5H, m), 6,95 (5H, m), 3,48 (3H, s), 1,29 (9H, s), 1,05 (6H, m), 4,2-1,5 (m), 0,70 (12H, m).

MS (FAB^+): m/z 855;

MS (FAB^-): m/z 853

-90-

Éster de metilo de (5S,4RS)-5-((terc-butoxicarbonil-serilalanil-alanil)amino)-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina

d) A uma solução do composto do Exemplo 34(c) (31 mg, 36,2 mmol) em metanol:ácido acético 9:1, foi adicionado Pd a 10%/C (35 mg). A mistura foi agitada sob H_2 ($1,013 \times 10^5$ Pa) durante 6 horas. A mistura reaccional foi filtrada através de uma almofada de Celite® e o Celite® foi lavado sucessivamente com ácido acético, metanol, e acetato de etilo. A solução combinada foi evaporada sob pressão reduzida, originando o composto do título como cristais brancos (21 mg; rendimento de 75%).

RMN ($CDCl_3/CD_3OD$): δ 7,14 (5H, m), 4,33 (1H, m), 4,08 (4H, m), 3,60 (3H, s), 2,95 (1H, dd), 2,70 (1H, m), 2,35 (1H, m), 2,06 (2H, m), 1,72 (1H, m), 1,40 (9H, s), 1,22 (6H, m); 0,85 (12H, m).

MS (FAB⁺): m/z 765;

MS (FAB⁻): m/z 764.

Exemplo 35

Preparação de éster de metilo de (4RS,5S)-5-(terc-butiloxicarbonil-serilalanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)-hexil-valil valina

Éster de metilo de (5S)-5-(terc-butiloxicarbonilamino)-1,4-dioxo-6-(4-benziloxifenil)hexil-valil valina

a) A uma solução do composto do Exemplo 13(c) (810 mg, 1,9 mmol) em THF (20 ml), a -40°C sob uma atmosfera de argon, foi adicionada N-metilmorfolina (0,27 ml, 2,5 mmol), seguida por cloreto de isobutilo (0,246 ml, 1,9 mmol). A mistura reaccional foi agitada durante 15 min, e mais N-metilmorfolina (0,27 ml, 2,5 mmol) foi adicionada seguida pelo sal cloridrato de éster de metilo de valil valina (459 mg, 1,7 mmol). A mistura resultante foi agitada a -40°C durante 30 min, em seguida deixada aquecer até à temperatura ambiente e agitada durante 17 h. A mistura reaccional foi diluída com acetato de etilo: CH_2Cl_2 1:1 e lavada sucessivamente com HCl a 5%, $NaHCO_3$ aquoso a 5%, e NaCl aquoso saturado. A solução foi seca ($MgSO_4$), filtrada e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo sólido foi purificado por cromatogra

-91-

fia de coluna utilizando gel de sílica, eluindo com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 40:1, originando o composto do título (838 mg, 76%).

RMN (CDCl_3): δ 7,4 (5H, m), 7,02 (4H, dd), 6,42 (1H, br d), 6,18 (1H, br d), 5,19 (1H, br d), 5,0 (2H, s), 4,51 (2H, m), 4,25 (1H, m), 3,70 (3H, s), 3,04 (1H, m), 2,82 (3H, m), 2,48 (2H, m), 2,15 (2H, m), 1,39 (9H, s), 0,91 (12H, m).

Éster de metilo de (4RS,5S)-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-benziloxifenil)hexil-valil valina

b) A uma solução do composto do Exemplo 35(a) (144 mg, 0,225 mmole) em metanol a 0°C, foi adicionado boro-hidreto de sódio (4,28 mg, 0,113 mmole), em fracções. Após 20 min., a mistura foi diluída com HCl a 5% e extraída (3x) com diclorometano. Os extractos orgânicos foram secos (MgSO_4), filtrados e evaporados até um sólido branco. O produto em bruto foi purificado por cromatografia flash sobre gel de sílica (clorofórmio:metanol 20:1) produzindo o tripéptido como cristais brancos (118 mg; rendimento de 82%).

RMN (CDCl_3): δ 7,4 (5H, m), 7,02 (4H, dd), 6,40 (2H, m), 5,03 (2H, s), 4,54 (2H, m), 4,30 (1H, m), 3,70 (3H, s), 3,61 (2H, m), 3,0 a 1,6 (11H, m), 1,38 (9H, s), 0,91 (12H, m).

Éster de metilo de (4RS,5S)-5-(terc-butiloxicarbonil-(O-fenilmetil)serilalanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-benziloxifenil)-hexil-valil valina

c) O tripéptido do Exemplo 35(b) (115 mg, 0,179 mmol) é tratado com ácido trifluoroacético e HCl, de acordo com o processo do Exemplo 34(c). O sal cloridrato resultante foi acoplado ao Boc-Ser(Bzl)-Ala-Ala (83 mg, 0,19 mmol) utilizando a N-metilmorfolina (50 mg, 0,51 mmol), e cloroformato de isobutilo (26 mg, 0,19 mmol). O hexapéptido do título foi obtido como cristais brancos (40 mg; rendimento de 25%).

RMN ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): δ 7,35 (10H, m), 6,91 (4H, dd), 4,95 (2H, d), 4,48 (2H, d), 4,37 (1H, d), 4,07 (4H, m), 3,62 (4H, s), 3,60 (1H, obsc m), 2,5 a 1,5 (3H, m), 1,38 (9H, s), 1,2 (6H, m), 0,80 (12H, m).

Éster de metilo de (4RS,5S)-5-(terc-butoxicarbonil-serilalanil-alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxi-fenil)hexil-valil valina

d) O composto do Exemplo 35(c) (39 mg, 40,6 μ mol) foi desprotegido pelo processo de hidrogenólise do Exemplo 34(d). O composto do título foi obtido como cristais brancos (2,3 mg; rendimento de 73%).

RMN ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): δ 6,79 (4H, m), 4,35 (1H, q), 4,2 a 3,8 (5H, m), 3,67 (3H, s), 3,0 a 2,5 (2H, m), 2,5 a 1,5 (4H, m), 1,41 (9H, s), 1,20 (6H, m), 0,89 (12H, m).

Exemplo 36

Preparação de éster de metilo de (3R,4S)-4-(terc-butiloxicarbonil-serilalanilalanil)-amino-2,2-difluoro-3-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentil-valil valina

Éster de metilo de (3R,4S)-4-(benziloxicarbonil)amino-2,2-difluoro-3-hidroxi-5-fenilpentanoil-valil valina

a) Trietilamina (0,66 ml, 4,83 mmol) foi adicionada a uma solução do composto do Exemplo 14(b) (0,82 g; 2,20 mmol), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi tris(dimetilaminofosfônio) 1,07 g, 2,41 mmol) e cloridrato de éster de metilo de valil valina (0,64 g, 2,41 mmol) em 75 ml de acetonitrilo seco. Após 4 horas de agitação, foi introduzida mais trietilamina pura (0,66 ml, 4,83 mmol) e a mistura reaccional foi agitada durante toda a noite. A solução foi diluída com acetato de etilo e lavada sucessivamente com HCl 2N, NaHCO_3 a 5% e H_2O . Após secagem sobre MgSO_4 e filtração, a solução foi concentrada in vacuo. A cromatografia flash, com CHCl_3 :metanol 40:1 como eluente, forneceu o tripéptido do título como um sólido flocoso branco (466 mg; rendimento de 36%).

RMN (CDCl_3): δ 7,34 (10H, m), 6,93 (1H, br, $J=7,1$ Hz), 6,75 (1H, br d, $J=8,9$ Hz), 5,03 (2H, s), 4,87 (1H, m), 4,60 (1H, m), 4,38 (3H, m), 3,63 (3H, s), 3,07 (2H, m), 2,32 (1H, m), 2,14 (1H, m), 1,93 (1H, m), 0,98 (12H, m)

MS: m/z 592

-93-

Éster de metilo de (3R,4S)-4-amino-2,2-difluoro-3-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentil-valil valina, cloridrato

b) Uma solução do tripéptido do Exemplo 36(a) (466 mg, 0,79 mmol) em ácido acético glacial (40 ml) contendo Pd a 10%/C (450 mg), foi saturada com o gás H_2 e agitada durante toda a noite sob uma atmosfera de H_2 . Após filtração através de uma almofada de Celite[®], a solução foi diluída com metanol e tratada com HCl concentrado (100 μ l, 1,0 mmol). A concentração da solução in vacuo produziu o cloridrato do tripéptido em bruto como um sólido cristalino branco macio (390 mg, 100%).

Éster de metilo de (3R,4S)-4-(terc-butiloxicarbonil-(O-benzil)-serilalanilalanil)amino-2,2-difluoro-3-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentil-valil valina

c) A uma solução de Boc-Ser(Bzl)-Ala-Ala (380 mg, 0,87 mmol) em N-metil morfolina (108 μ l, 0,99 mmol) em THF seco (6 ml), a -40°C, foi adicionado cloroformato de isobutilo (112 ml, 0,87 mmol), gota a gota. Após agitação durante 30 min, foi adicionada N-metil morfolina (112 ml, 0,87 mmol), seguida pela adição do composto do Exemplo 36(b) como um sólido. A mistura reaccional foi agitada durante toda a noite, com aquecimento gradual até à temperatura ambiente. A solução foi diluída com CH_2Cl_2 e lavada sucessivamente com HCl a 10%, $NaHCO_3$ a 5% e H_2O . A fracção orgânica foi seca sobre $MgSO_4$, filtrada e concentrada in vacuo. A cromatografia flash, com $CHCl_3$:metanol 30:1 como eluente, forneceu o hexapéptido do título como um sólido amarelo claro (636 mg, 83%).

RMN ($DMSO-d_6$): δ 8,31 (1H, brd; $J=7,1$ Hz), 8,12 (1H, brd; $J=9,5$ Hz), 7,98 (1H, brd; $J=6,5$ Hz), 7,78 (2H, m), 7,31 (5H, m), 7,18 (5H, m), 6,99 (1H, brd; $J=7,1$ Hz), 6,28 (1H, m), 4,48 (2H, s), 4,22 (4H, m), 3,62 (3H, s), 3,57 (1H, m), 2,98 (1H, m), 2,71 (1H, m), 2,17 (2H, m), 1,41 (9H, s), 1,15 (3H, d; $J=6,5$ Hz), 1,03 (3H, d; $J=7,1$ Hz), 0,92 (12H, m).

MS (FAB +): $m/z=877$ ($M+H^+$)

Éster de metilo de (3R,4S)-4-(terc-butiloxicarbonil-serilalanilalanil)amino-2,2-difluoro-3-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentil-valil-L-valina

d) O hexapéptido protegido do Exemplo 36(c) (13 mg, 15 mmol) foi dissolvido em ácido acético:metanol 5:1 (6 ml). A esta solução, foi adicionado Pd a 10%/C (15 mg) e a mistura foi saturada com o gás H_2 . Após agitação durante toda a noite sob uma atmosfera de H_2 , a solução foi filtrada através de uma almofada de Celite® e concentrada in vacuo, fornecendo o produto do título como um sólido cristalino branco (11,5 mg, 99%).

RMN ($CDCl_3/CD_3OD$): δ 7,24 (5H, m), 4,18 (6H, m), 3,77 (1H, m), 3,65 (3H, s), 3,52 (1H, m), 3,09 (1H, m), 2,87 (1H, m), 2,03 (3H, m), 1,39 (9H, s), 1,31 (3H, d, $J=5,94$ Hz), 1,06 (3H, d, $J=6,6$ Hz), 0,90 (12H, m)

MS: m/z 787

Exemplo 37

Preparação de éster de metilo de (3R,4S)-4-(serilalanilalanil)amino-2,2-difluoro-3-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentil-valil valina, sal de ácido trifluoroacético

Duas gotas de TFA foram adicionadas ao hexapéptido protegido em N do Exemplo 36(d) (1,1 mg, 1,4 mmol). Após 2 horas, uma corrente lenta de argon foi passada sobre a mistura para evaporar o TFA em excesso. Foram adicionadas três gotas de éter dietílico e evaporadas, da mesma maneira, três vezes. O resíduo foi seco in vacuo.

Exemplo 38

Preparação de éster de metilo de 4-(terc-butiloxycarbonil-serilalanilalanil)amino-2,2-difluoro-1,3-dioxo-5-fenilpentil-valil valina

Éster de metilo de 4-(terc-butiloxycarbonil-(O-benzil)serilalanilalanil)amino-2,2-difluoro-1,3-dioxo-5-fenilpentil-valil valina

a) Numa solução do α, α -difluoro álcool do Exemplo 37 (102 mg, 0,12 mmol) e de periodinano de Dess-Martin (247 mg, 0,58 mmol) em 2 ml de DMF seco, foi introduzido TFA puro (45 μ l, 0,58 mmol), gota a gota. Após agitação durante 16 h, a solução foi diluída com Et_2O e vertida sobre uma mistura de $NaHCl_3$ aquoso saturado (20 ml) e tio-sulfato de sódio aquoso a 10% (7 ml). A mistu

ra foi agitada vigorosamente durante 1 hora e extraída com acetato de etilo. Os extractos combinados foram secos sobre $MgSO_4$, filtrados e concentrados in vacuo. A cromatografia flash utilizando uma eluição de gradiente de 0-30% de metanol em clorofórmio produziu a α, α -difluoro cetona do título como um sólido branco (70 mg, rendimento de 69%).

RMN ($CDCl_3/CD_3OD$): δ 7,27 (10H, m), 4,50 (2H, s), 4,34 (6H, m), 3,71 (3H, s), 3,66 (2H, m), 3,25 (1H, m), 2,99 (1H, m), 2,24 (2H, m), 1,42 (9H, s), 1,34 (3H, m), 1,08 (3H, m), 0,92 (12H, m).

MS (FAB +): m/z 875 ($M+H^+$).

Éster de metilo de 4-(terc-butiloxicarbonil-serilalanilalanil)amino-2,2-difluoro-1,3-dioxo-5-fenilpentil-valil valina

b) Uma solução do hexapéptido protegido do Exemplo 38(a) (15 mg, 17 μ mol) em ácido acético glacial (4 ml), contendo Pd a 10%/C (15 mg), foi saturada com o gás H_2 e agitada durante toda a noite sob uma atmosfera do gás H_2 . A mistura foi filtrada através de uma almofada de Celite® e concentrada in vacuo. A cromatografia flash, utilizando uma eluição por gradiente de 0-50% de metanol em clorofórmio, forneceu o produto desbenzilado do título como um sólido cristalino branco (9 mg, 67%).

RMN ($DMSO-d_6$): δ 9,01 (1H, m), 8,36 (2H, m), 7,95 (2H, m), 7,17 (5H, m), 6,68 (1H, m), 4,85 (1H, m), 4,18 (4H, m), 3,91 (1H, m), 3,58 (3H, s), 3,45 (2H, m), 3,08 (2H, m), 2,66 (1H, m), 2,00 (2H, m), 1,45 (9H, s), 1,11 (6H, m), 0,88 (12H, m).

MS (FAB +): m/z 785 ($M+H^+$).

Exemplo 39

Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

A resina-heptapéptido protegido Boc-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada da forma usual, de acordo com o Exemplo 1. Após remoção do grupo Boc do terminal N com TFA a 50% em CH_2Cl_2 e neutralização do sal de TFA resultante com DIEA a 7% em CH_2Cl_2 , o péptido ligado à resina foi acetilado com anidrido acético (2 ml) em CH_2Cl_2 (30 ml) durante 30 minutos.

O péptido foi clivado da resina com remoção dos grupos

-96-

protectores da cadeia lateral por tratamento com HF líquido anidro (10 ml), em presença de anisol (1 ml), a 0°C durante 50 minutos. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter etílico e seca ao ar. A resina foi então extraída com 2 x 30 ml de HOAc a 1%/H₂O, seguido por 2x 30 ml de HOAc a 10%/H₂O. Os extractos combinados foram liofilizados produzindo 318 mg do péptido em bruto.

Uma alíquota de 130 mg do péptido em bruto foi purificada por filtração em gel numa coluna de 2,6 x 70 cm de Sephadex^R G-15, utilizando HOAc a 1% como eluente. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 120 mg do composto do título.

TLC: (n-BuOH/HOAc/H₂O 4:1:1) R_f=0,34; (n-BuOH/EtOAc/HOAc/H₂O 1:1:1:1) R_f=0,66; HPLC k'=3,0 (Hamilton PRP-1, CH₃CN/H₂O/TFA a 0,1%, 10% a 40% de CH₃CN, 15 minutos, gradiente linear, 1,5 ml/min.);

FAB-MS: m/z 847,6 (M+H⁺).

Substituindo no processo acima o Boc-Ser(Bzl) por Boc-Thr(Bzl) produziu Ac-Thr-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂.

Exemplo 40

Preparação de Ac-Ser-Ala-Ala-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

A resina-heptapéptido protegida Boc-Ser(Bzl)-Ala-Ala-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada da forma usual. Após remoção do grupo Boc do terminal N com TFA a 50% em CH₂Cl₂, e neutralização do sal de TFA resultante com DIEA a 7% em CH₂Cl₂, o péptido ligado à resina foi acetilado com anidrido acético (2 ml) em CH₂Cl₂ (30 ml) durante 30 minutos.

O péptido foi clivado da resina com remoção dos grupos protectores da cadeia lateral por tratamento com HF líquido anidro (10 ml), em presença de anisol (1 ml), a 0°C durante 50 minutos. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter etílico e seca ao ar. A resina foi então extraída com 2x 30 ml de HOAc a 1%/H₂O, seguido por 2x 30 ml de HOAc a 10%/H₂O. Os extractos combinados foram liofilizados produzindo 599 mg do péptido em bruto.

O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente utilizando o sistema $n\text{-BuOH/HOAc/H}_2\text{O}$ 4:1:5. As fracções apropriadas foram reunidas, evaporadas até à secura e o resíduo foi liofilizado a partir de HOAc a 1%, produzindo 435 mg do péptido parcialmente purificado. Uma alíquota de 100 mg do péptido parcialmente purificado foi adicionalmente purificada por filtração em gel numa coluna de 2,6 x 70 cm de Sephadex® G-15, utilizando HOAc a 1% com eluente. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 95 mg do composto do título purificado.

TLC: ($n\text{-BuOH/HOAc/H}_2\text{O}$ 4:1:1) $R_f=0,72$; HPLC $k'=2,8$ (Hamilton PRP-1, $\text{CH}_3\text{CN/H}_2\text{O/TEA}$ a 0,1%, 5% a 40% de CH_3CN , 15 minutos, gradiente linear, 1,5 ml/min.);

FAB-MS: m/z 747 ($M+H^+$).

Exemplo 41

Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-D-Pro-Val-Val-NH₂

Uma mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(Bzl)-D-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisol, a 0°C durante 50 min. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3x 30 ml de HOAc glacial. Os extractos do HOAc foram combinados e liofilizados, produzindo 406 mg do péptido em bruto.

O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente em $n\text{BuOH/HOAc/H}_2\text{O}$ (4:1:5). As fracções apropriadas foram determinadas por TLC, reunidas e evaporadas até à secura, sendo o resíduo liofilizado a partir de HOAc a 1%, produzindo 260 mg do péptido purificado.

TLC: ($n\text{-BuOH-HOAc-H}_2\text{O}$ 4:1:1), $R_f=0,15$; ($n\text{-BuOH-HOAc-H}_2\text{O}$ 1:1:1), $R_f=0,54$; ($n\text{-BuOH-EtOAc-HOAc-H}_2\text{O}$ 1:1:1:1), $R_f=0,72$

FAB-MS: m/z 847 ($M+H^+$)⁺

Análise dos aminoácidos (hidrólise em HCl/TFA 2:1 contendo 0,005% p/v de fenol a 160°C durante uma hora); Asp, 1,00; Ser, 0,75; Glu, 0,99; Pro, 0,99; Val, 0,96; Tyr, 1,10

Exemplo 42Preparação de Dns-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Dns-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisol, a 0°C durante 50 minutos. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 30 ml de HOAc a 10% seguida por 2x 30 ml de HOAc a 1%. Os extractos do HOAc foram combinados e liofilizados, produzindo 290 mg do péptido em bruto.

O péptido em bruto (73 mg) foi purificado por filtração em gel em Sephadex[®] G-15, utilizando HOAc a 10% como eluente. As fracções apropriadas foram liofilizadas, produzindo 56 mg do péptido purificado.

TLC: (n-BuOH-HOAc-H₂O 4:1:1), $R_f=0,15$

HPLC (Hamilton PRP-1, CH₃CN/H₂O/TFA a 0,1%, gradiente de 5-40% de CH₃CN, 15 min), k' 3,32.

FAB-MS: m/z 1038 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos (hidrólise em HCl 6N a 110°C durante 24 horas): Asp, 1,00; Ser, 0,17; Glu, 1,00; Pro, 1,00; Val, 1,38; Tyr, 1,78.

Exemplo 43Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Arg-NH₂

Uma mole de resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Arg(Tos)-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisol, a 0°C durante 50 minutos. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3x30 ml de HOAc glacial. Os extractos do HOAc foram combinados e liofilizados, produzindo 639 mg do péptido em bruto.

O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente em nBuOH-HOAc-H₂O (4:1:5). As fracções apropriadas foram determinadas por TLC, reunidas, evaporadas até à secura e o

-99-

resíduo foi liofilizado a partir de HOAc a 1%, produzindo 518 mg do péptido parcialmente purificado. Uma alíquota de 100 mg do péptido parcialmente purificado foi adicionalmente purificada por filtração em gel em Sephadex[®] G-15 com HOAc a 1% com eluente. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 61,5 mg do péptido purificado.

TLC: (n-BuOH-piridina-HOAc-H₂O 15:10:3:12), R_f=0,43;

(nBuOH-EtOAc-HOAc-H₂O 1:1:1:1), R_f=0,34;

HPLC (Hamilton PRP-1, CH₃CN/H₂O/TFA a 0,1%, gradiente de 5-40% de CH₃CN, 15 min), k' 1,94.

FAB-MS: m/z 904 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos (hidrólise em HCl 6N a 110°C durante 18 horas): Asp, 1,00; Ser, 0,98; Glu, 1,00; Pro, 0,88; Val, 0,56; Tyr, 0,86; Arg, 0,67.

Exemplo 44

Preparação de Ac-Ser-Gln-Ala-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mole de resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Ala-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisol, 1 hora a 0°C. A resina-péptido foi lavada com éter e o péptido foi extraído com ácido acético glacial. O extracto foi liofilizado, originando 220 mg, rendimento de 55%. 100 mg do péptido em bruto foram purificados por filtração em gel em Sephadex[®] G-15 utilizando HOAc a 1% como eluente, produzindo 85 mg. Gradiente da HPLC: 5% a 40%, TFA a 0,1% (CH₃CN), linear, 15 min, k'=2,61

TLC: (B:A:W 1:1:1), R_f=0,67.

FAB-MS: m/z 804 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: (HCl:TFA 2:1, 0,005% p/v de fenol, 160°C, 1 hora), Ser 0,89, Glu 1,00, Pro 1,04, Ala 1,00, Val 1,75, Tyr 0,89. Conteúdo em péptido é de 98,94%.

Exemplo 45

Preparação de Ac-Ser-Ser-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mole da resina-péptido protegida Ac-Ser(Bzl)-Ser-(Bzl)-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisol, 1 hora a 0°C. A resina-péptidilo foi lavada com éter

e o péptido foi extraído com ácido acético glacial. O extracto foi liofilizado originando 283 mg, rendimento de 70%. 100 mg do péptido em bruto foram purificados por filtração em gel em Sephadex[®] utilizando HOAc a 1% como eluente, produzindo 78 mg. Gradiente da HPLC: 5% a 40%, TFA a 0,1% (CH₃CN), linear, 15 min, k'=2,58

TLC: $R_f=0,70$, B:A:W 1:1:1

FAB-MS: m/z 806 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: (HCl:TFA 2:1, 0,005 p/v de fenol, 160°C, 1 hora), Asp 1,00, Ser 1,59, Pro 0,90, Val 1,91, Tyr 0,91.

Conteúdo em péptidos era de 80,6%.

Exemplo 46

Preparação de Ac-Ser-Arg-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Arg-Asn-Tyr(Bzl)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisol, 1 hora a 0°C. A resina-péptidilo foi lavada com éter e o péptido foi extraído com ácido acético glacial. O extracto foi liofilizado originando 348,5 mg, rendimento de 80%. 100 mg do péptido em bruto foram purificados por filtração em gel em Sephadex[®] G-15, utilizando HOAc a 1% como eluente, produzindo 87 mg.

Gradiente da HPLC: 5% a 40%, TFA a 0,1% (CH₃CN), linear, 15 min, k'=2,64

TLC: (B:A:W 1:1:1), $R_f=0,60$

FAB-MS: m/z 875 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: HCl/TFA/Fenol, Asp 1,00, Ser 0,80, Pro 0,83, Val 1,85, Tyr 0,94, Arg 0,97. Conteúdo em péptidos era de 101,3%.

Exemplo 47

Preparação de Ac-Ser-Lys-Asn-Tyr-Pro-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Lys-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisol, 1 hora a 0°C. A resina péptidilo foi lavada com éter e o péptido foi extraído com ácido acético glacial. O extracto foi liofilizado originando 343,79 mg, rendimento de 81%.

100 mg do péptido em bruto foram purificados por filtração em gel em Sephadex[®] G-15, utilizando HOAc a 1% como eluente, produzindo 87 mg.

Gradiente da HPLC: 5% a 40%, TFA a 0,1% (CH₃CN), linear, 15 min, k'=2,47

TLC: (B:A:W 1:1:1), $R_f=0,60$

FAB-MS: m/z 847 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: (HCl:TFA 2:1, 0,005% p/v de fenol, 160°C, 1 hora), Asp 1,00, Ser 0,81, Pro 0,95, Val 1,87, Tyr 1,00, Lys

-101-

0,84. Conteúdo em péptido era de 92,3%.

Exemplo 48

Preparação de Ac-Ser-Glu-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Glu-(OBzl)-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina com 10 ml de HF/1 ml de anisol, 1 hora a 0°C. A resina-péptidilo foi lavada com éter e o péptido foi extraído com ácido acético glacial. O extracto foi liofilizado originando 286,22 mg, rendimento de 67%.

100 mg do péptido em bruto foram purificados por filtração em gel em Sephadex[®] G-15 utilizando HOAc a 1% como eluente, produzindo 77 mg.

TLC: (B:A:W 1:1:1), $R_f=0,38$

Gradiente da HPLC: 5% a 40%, TFA a 0,1% (CH₃CN), linear, 15 min, $k'=2,72$

FAB-MS: m/z 848 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: HCl/TFA/Fenol, Asp 1,06, Ser 0,84, Glu 1,00, Pro 0,88, Ala 1,00, Val 1,85, Tyr 1,00. Conteúdo em péptidos era de 94,3%.

Exemplo 49

Preparação de Ac-Ser-Ala-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegido Ac-Ser(Bzl)-Ala-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina com 10 ml de HF/1 ml de anisol, 1 hora a 0°C. A resina-péptidilo foi lavada com éter e o péptido foi extraído com ácido acético glacial. O extracto foi liofilizado originando 330 mg, rendimento de 84%.

100 mg do péptido em bruto foram purificados por filtração em gel em Sephadex[®] G-15 utilizando HOAc a 1% como eluente, produzindo 86 mg.

TLC: (B:A:W 1:1:1), $R_f=0,70$

Gradiente da HPLC: 5% a 40%, TFA a 0,1% (CH₃CN), linear, 15 min, $k'=2,62$

FAB-MS: m/z 790 $(M+H)^+$

Análise dos aminoácidos: HCl/TFA/Fenol, Asp 1,00, Ser 0,81, Pro 0,94, Ala 1,00, Val 1,87, Tyr 0,76. Conteúdo em péptidos era de 72,77%.

Exemplo 50

Preparação de Ac-Ser-Gln-Ser-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Ser(Bzl)-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina com 10 ml de HF/1 ml de anisol, 1 hora a 0°C. A resina-péptidilo foi lavada com éter e o péptido foi extraído com ácido acético glacial. O extracto foi liofilizado originando 285 mg, rendimento de 70%. 100 mg do péptido em bruto foram purificados por filtração em gel em Sephadex® G-15 utilizando HOAc a 1% como eluente, produzindo 87 mg.

TLC: (B:A:W 1:1:1), $R_f=0,68$

Gradiente da HPLC: 5% a 40%, TFA a 0,1% (CH_3CN), linear, 15 min, $k'=2,51$

FAB-MS: m/z 820 $(M+H)^+$

Análise dos aminoácidos: HCl/TFA/Fenol, Ser 1,60, Glu 1,00, Pro 0,91, Val 1,83, Tyr 0,94. Conteúdo em péptidos era de 84%.

Exemplo 51

Preparação de Ac-Ser-Gln-Arg-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Arg-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina com 10 ml de HF/1 ml de anisol, 1 hora a 0°C. A resina-péptidilo foi lavada com éter e o péptido foi extraído com ácido acético glacial. O extracto foi liofilizado originando 380,54 mg, rendimento de 86%. 100 mg do péptido em bruto foram purificados por filtração em gel em Sephadex® G-15 utilizando HOAc a 1% como eluente, produzindo 89 mg.

TLC: (B:A:W 1:1:1), $R_f=0,66$

Gradiente da HPLC: 5% a 40%, TFA a 0,1% (CH_3CN), linear, 15 min, $k'=2,58$

-103-

FAB-MS: m/z 889 $(M+H)^+$

Análise dos aminoácidos: HCl/TFA/Fenol, Ser 0,80, Glu 1,00, Pro 1,00, Val 1,88, Arg 1,01, Tyr 0,81. Conteúdo em péptidos era de 85,33%.

Exemplo 52

Preparação de Ac-Ser-Gln-Lys-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Lys(Clz)-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima, o péptido foi clivado da resina com 10 ml de HF/1 ml de anisol, 1 hora a 0°C. A resina-péptidilo foi lavada com éter e o péptido foi extraído com ácido acético glacial. O extracto foi liofilizado originando 322 mg, rendimento de 77,32%. 100 mg do péptido em bruto foram purificados por filtração em gel em Sephadex[®] G-15 utilizando HOAc a 1% como eluente, originando 85 mg.

TLC: (B:A:W 1:1:1), $R_f=0,69$ Gradiente da HPLC: 5% a 40%, TFA a 0,1% (CH₃CN), linear, 15 min, $k'=2,48$ FAB-MS: m/z 861 $(M+H)^+$

Análise dos aminoácidos: HCl/TFA/Fenol, Ser 0,79, Glu 1,00, Pro 0,94, Val 1,85, Tyr 0,96, Lys 0,90, Conteúdo em péptido é de 71,26%.

Exemplo 53

Preparação de Ac-Ser-Gln-Asp-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asp(OBzl)-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina com 10 ml de HF/1 ml de anisol, 1 hora a 0°C. A resina-péptidilo foi lavada com éter e o péptido foi extraído com ácido acético glacial. O extracto foi liofilizado originando 340 mg, rendimento de 80%. 100 mg do péptido em bruto foram purificados por filtração em gel, em Sephadex[®] G-15 utilizando HOAc a 1% como eluente, produzindo 84 mg.

TLC: (B:A:W 1:1:1), $R_f=0,73$ Gradiente da HPLC: 5% a 40%, TFA a 0,1% (CH₃CN), linear, 15 min, $k'=2,63$ FAB-MS: m/z 848 $(M+H)^+$

Análise dos aminoácidos: HCl/TFA/Fenol, Asp 1,02, Ser 0,79, Glu 1,00, Pro 0,97, Val 1,86, Tyr 0,82. Conteúdo em péptidos é de 79,13%.

Exemplo 54

Preparação de Ac-Asp-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Asp(OBzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado e desprotegido utilizando 10 ml de HF anidro com 10% de anisol a 0°C durante 1 hora. O HF foi removido, in vacuo a 0°C e a resina foi lavada com éter dietílico. O péptido foi extraído com ácido acético glacial e liofilizado originando 288 mg (65,9%). O péptido foi purificado por distribuição em contracorrente em 1-butanol-ácido acético-água (4:1:5 v/v/v). Os tubos foram analisados por cromatografia em camada fina (TLC) e as fracções apropriadas foram reunidas, evaporadas e liofilizadas a partir de HOAc 0,2 N, produzindo 234 mg (81,2%).

TLC: (B:E:A:W 1:1:1:1) $R_f=0,77$; (B:P:A:W 15:10:3:12) $R_f=0,56$.

FAB MS: m/z 875 (M+H)⁺

HPLC: 4,5 mm X 25 cm Altex Ultrasphere 5 m ODS, detecção com UV a 220 nm, água-acetonitrilo-TFA a 0,1%, gradiente de 5 a 40% de acetonitrilo durante 15 min., $k' = 3,71$

HPLC isocrática: 85:15 água-acetonitrilo-TFA a 0,1%, $k'=4,77$

Análise dos aminoácidos: (hidrólise a 160°C durante 1 h em HCl/TFA 2:1 contendo 0,005% p/v de fenol) Asp 2,05, Glu 1,00, Pro 1,03, Val 1,94, Tyr 0,84

Exemplo 55

Preparação de Ac-His-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Ac-His(Tos)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado e desprotegido utilizando 10 ml de HF anidro com 10% de anisol, a 0°C durante 1 h. O HF foi removido, in vacuo a 0°C, e a resina foi lavada com éter dietílico. O péptido foi extraído com ácido acético glacial e liofilizado originando 311 mg (69,4%). O péptido foi parcialmente purificado por distribuição

-105-

em contracorrente em 1-butanol-ácido acético-água (4:1:5 v/v/v). Os tubos foram analisados por cromatografia de camada fina (TLC) e as frações apropriadas foram reunidas, evaporadas e liofilizadas a partir de HOAc 0,2 N, produzindo 200 mg (65,3%). A purificação final foi obtida submetendo 87 mg a filtração em gel em Sephadex^R G-15 utilizando HOAc 0,2 N como eluente, produzindo 48 mg (55,2%).

TLC (B:P:A:W 15:10:3:12) $R_f=0,51$; (B:A:W 1:1:1) $R_f=0,71$.

HPLC: 4,5 mm X 25 cm Altex Ultrasphere 5 m ODS, detecção com UV a 220 nm, água-acetonitrilo- TFA a 0,1%, gradiente de 5 a 40% de acetonitrilo durante 15 min., $k'=4,94$

HPLC isocrática: 85:15 água-acetonitrilo- TFA a 0,1%, $k'=3,76$

FAB MS: m/z 897 $(M+H)^+$

Análise dos aminoácidos: (hidrólise a 160°C durante 1 h em HCl/TFA 2:1 contendo 0,005% p/v de fenol) Asp 1,03, Glu 1,00, Pro 1,13, Val 2,00, Tyr 1,97, His 1,28.

Exemplo 56

Preparação de Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Boc-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado e desprotegido utilizando 10 ml de HF anidro com 10% de anisol, a 0°C durante 1 h. O HF foi removido, in vacuo a 0°C, e a resina foi lavada com éter dietílico. O péptido foi extraído com ácido acético glacial e liofilizado originando 225 mg (55,9%). O péptido foi purificado por distribuição em contracorrente em 1-butanol-ácido acético-água (4:1:5 v/v/v). Os tubos foram analisados por cromatografia de camada fina (TLC) e as frações apropriadas foram reunidas, evaporadas e liofilizadas a partir de HOAc 0,2 N, produzindo 188 mg (83,5%).

TLC: (B:E:A:W 1:1:1:1) $R_f=0,68$; (B:P:A:W 15:10:3:12) $R_f=0,54$.

HPLC: 4,5 mm X 25 cm Altex Ultrasphere 5 m ODS, detecção com UV a 220 nm, água-acetonitrilo- TFA a 0,1%, gradiente de 5 a 40% de acetonitrilo durante 15 min., $k'=4,89$

HPLC isocrática: 85:15 água-acetonitrilo- TFA a 0,1%, $k'=2,78$

FAB MS: m/z 805,6 ($M+H$)⁺

Análise dos aminoácidos: (hidrólise a 160°C durante 1 h em HCl/TFA 2:1 contendo 0,005% p/v de fenol) Asp 1,03, Ser 0,78, Glu 1,00, Pro 0,88, Val 1,93, Tyr 0,66.

Substituindo por ácido 3-benziloxi-propanóico a Boc-Ser(Bzl) na sequência acima produz a 3-hidroxipropionilglutaminilasparginiltirosilpropilvalil valinamida, a qual é um péptido des-amino.

Substituindo por Boc-D-Ser(Bzl) a Boc-Ser(Bzl) na sequência de reacções acima, produz D-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂.

Exemplo 57

Preparação de Ac-Ser-Gln-Gly-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Gly-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado e desprotegido utilizando 10 ml de HF anidro com 10% de anisol, a 0°C durante 1 hora. O HF foi removido, in vacuo a 0°C e a resina foi lavada com éter dietílico. O péptido foi extraído com ácido acético glacial e liofilizado originando 200 mg (50,6%). O péptido foi purificado por distribuição em contracorrente em 1-butanol-ácido acético-água (4:1:5 v/v/v). Os tubos foram analisados por cromatografia em camada fina (TLC) e as frações apropriadas foram reunidas, evaporadas e liofilizadas a partir de HOAc 0,2 N, produzindo 145 mg (72,5%).

TLC: (B:E:A:W 1:1:1:1) R_f =0,63; (B:A:W 4:1:1) R_f =0,40.

HPLC: 4,5 mm X 25 cm Altex Ultrasphere 5 m ODS, detecção com UV a 220 nm, água-acetonitrilo- TFA a 0,1%, gradiente de 5 a 40% de acetonitrilo durante 15 min, k' =4,56

HPLC isocrática: 85:15 água-acetonitrilo- TFA a 0,1%, k' =3,46

FAB MS: m/z 790 ($M+H$)⁺

Análise dos aminoácidos: (hidrólise a 160°C durante 1 h em HCl/TFA 2:1 contendo 0,005% p/v de fenol) Ser 0,71, Glu 0,97, Gly 1,00, Pro 1,02, Val 1,70, Tyr 0,76.

-107-

Exemplo 58Preparação de Ala-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Boc-Ala-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado e desprotegido utilizando 10 ml de HF anidro com 10% de anisol, a 0°C durante 1 h. O HF foi removido, in vacuo a 0°C, e a resina foi lavada com éter dietílico. O péptido foi extraído com ácido acético glacial e liofilizado originando 245 mg (56,0%). O péptido foi purificado por distribuição em contracorrente em 1-butanol-ácido acético-água (4:1:5 v/v/v). Os tubos foram analisados por cromatografia em camada fina (TLC) e as frações apropriadas foram reunidas, evaporadas e liofilizadas a partir de HOAc 0,2 N, produzindo 185 mg (75,5%).

TLC: (B:E:A:W 1:1:1:1) $R_f=0,64$; (B:P:A:W 15:10:3:12) $R_f=0,60$

HPLC: 4,5 mm X 25 cm Altex Ultrasphere 5 m ODS, detecção com UV a 220 nm, água-acetonitrilo- TFA a 0,1%, gradiente de 5 a 40% de acetonitrilo durante 15 min, $k'=3,86$

HPLC isocrática: 85:15 água-acetonitrilo- TFA a 0,1%, $k'=2,71$

FAB MS: m/z 876 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: (hidrólise a 160°C durante 1 h em HCl/TFA 2:1 contendo 0,005% p/v de fenol) Asp 1,00, Ser 0,69, Glu 0,98, Pro 0,95, Ala 0,99, Val 1,91, Tyr 0,94.

Exemplo 59Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-(4'NO₂)Phe-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-(4'NO₂)Phe-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina com 15 ml de HF/1 ml de anisol, 1 hora a 0°C. A resina-péptidilo foi lavada com éter e o péptido foi extraído com ácido acético glacial. O extracto foi liofilizado originando 701,8 mg, rendimento de 80%. 100 mg do péptido em bruto foram purificados por filtração em gel em Sephadex® G-15, utilizando HOAc a 1% como eluente, produzindo 68 mg. Uma alíquota de 35 mg foi adicionalmente purificada por HPLC preparativa (PRP-1 semi prep, 18% de TFA a 0,1% (CH₃CN), 6 ml/min) produzindo 22 mg.

-108-

TLC: (B:A:W 1:1:1), $R_f=0,54$ Gradiente da HPLC: 5% a 40%, TFA a 0,1% (CH_3CN), linear, 15 min, $k'=3,18$ FAB-MS: m/z 876 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

Análise dos aminoácidos: (hidrólise a 160°C durante 1 h em HCl/TFA 2:1 contendo 0,005% p/v de fenol) Asp 1,01, Ser 0,81, Glu 1,00, Pro 0,90, Val 2,00, nitroPhe 0,91. Conteúdo em péptidos é de 103,67%.

Exemplo 60

Preparação de Dns-Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-OH

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Boc-Arg(Tos)-Ala-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val- resina de Merrifield foi preparada como acima. Após remoção do grupo Boc com TFA a 50%/CH₂Cl₂ e neutralização com DIEA a 7%/CH₂Cl₂, o péptido foi danilado por adição de 3 equiv. de cloreto de dansilo em DMF e reacção durante uma hora. O péptido dansilo foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisol, a 0°C durante 50 min. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc glacial. Os extractos do HOAc foram combinados e liofilizados, produzindo 321 mg do péptido em bruto.

Uma alíquota de 100 mg do péptido em bruto foi purificada por filtração em gel numa coluna de 2,6 x 70 cm de Sephadex[®] G-15 utilizando HOAc a 1% como eluente. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 74,6 mg do péptido do título.

TLC: (B:A:W 1:1:1) $R_f=0,84$ HPLC: (Hamilton PRP-1, CH₃CN/H₂O/TFA a 0,1%, gradiente de 5-40% de CH₃CN, 15 min), $k'=3,61$.FAB-MS: m/z 1266 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

Análise dos aminoácidos: (hidrólise em HCl/TFA 2:1 contendo 0,005% p/v de fenol a 160°C durante uma hora): Asp, 1,00; Ser, 0,31; Glu, 0,91; Pro, 0,99; Ala, 0,96; Val, 1,96; Tyr, 1,19; Arg, 0,85.

-109-

Exemplo 61Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-Gln-Asn-NH₂

Uma mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-Gln-Asn-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisol, a 0°C durante 50 min. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc glacial. Os extractos do HOAc foram combinados e liofilizados originando 862,3 mg do péptido em bruto.

O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente em nBuOH-HOAc-H₂O (4:1:5). As fracções apropriadas foram determinadas por TLC, reunidas, evaporadas até à secura e o resíduo foi liofilizado a partir de HOAc a 1%, produzindo 712,9 mg do péptido do título.

TLC: (B:A:W 1:1:1) $R_f=0,61$

HPLC: (Hamilton PRP-1, CH₃CN/H₂O/TFA a 0,1%, gradiente de 5-40% de CH₃CN, 15 min), $k'=2,17$.

FAB-MS: m/z 1089 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: (hidrólise em HCl/TFA 2:1 contendo 0,005% p/v de fenol a 160°C durante uma hora): Asp, 1,81; Ser, 0,97; Glu, 2,00; Pro, 0,88; Val, 1,23; Tyr, 1,81.

Exemplo 62Preparação de Ac-Ala-Thr-Leu-Asn-Phe-Pro-Ile-Ser-Pro-Ile-Glu-NH₂

Uma mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Ala-Thr(Bzl)-Leu-Asn-Phe-Pro-Ile-Ser(Bzl)-Pro-Ile-Glu(OBzl)-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisol, a 0°C durante 50 min. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 1% e 3 x 30 ml de HOAc a 50%. Os extractos de HOAc foram combinados, diluídos com água e liofilizados, originando 862,3 mg do péptido em bruto.

O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente em nBuOH-HOAc-H₂O (4:1:5). As fracções apropriadas

-110-

foram determinadas por TLC, reunidas, evaporadas até à secura e o resíduo foi liofilizado a partir de HOAc a 1%. O péptido foi adicionalmente purificado por filtração em gel numa coluna de 2,6x70 cm de Sephadex^R G-15, utilizando HOAc a 1% como eluente. As fracções apropriadas foram recolhidas e liofilizadas. Uma alíquota de 100 mg do péptido foi adicionalmente purificada por HPLC preparativa numa coluna Hamilton PRP-1 utilizando CH₃CN/H₂O/TFA a 0,1%, gradiente de 20-40% de CH₃CN, 15 min. As fracções apropriadas foram reunidas, evaporadas até à secura e liofilizadas a partir de HOAc glacial, produzindo 22,6 mg do péptido do título.

HPLC: (Hamilton PRP-1, CH₃CN/H₂O/TFA a 0,1%, gradiente de 5-40% de CH₃CN, 15 min), k'=2,94.

FAB-MS: m/z 1241 (M+H)⁺

EXEMPLO 63

Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-NH₂

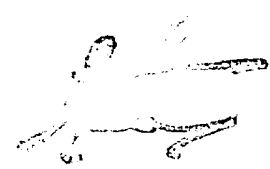
Uma mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisól, a 0°C durante 50 min. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 1% e 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos de HOAc foram combinados e liofilizados originando 144,7 mg do péptido em bruto.

O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente em nBuOH-HOAc-H₂O (4:1:5). As fracções apropriadas foram determinadas por TLC, reunidas, evaporadas até à secura, e o resíduo foi liofilizado a partir de HOAc a 1%, produzindo 150 mg do péptido. O péptido foi adicionalmente purificado por filtração em gel numa coluna de 2,6 x 70 cm de Sephadex[®] G-15 utilizando HOAc a 1% como eluente. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 101,3 mg do péptido do título.

TLC: (B:A:W 4:1:1) R_F=0,65

HPLC: (Hamilton PRP-1, CH₃CN/H₂O/TFA a 0,1%, gradiente de 5-40% de CH₃CN, 15 min), k'=2,08.

FAB-MS: m/z 748 (M+H)⁺



-111-

Análise dos aminoácidos: (hidrólise em HCl/TFA 2:1 contendo 0,005% p/v de fenol a 160°C durante uma hora): Asp, 1,00; Ser, 0,55; Glu, 0,98; Pro, 1,19; Val, 0,95; Tyr, 0,99.

Exemplo 64

Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-Arg-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-Arg(Tos)-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisol, a 0°C durante 50 min. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc glacial. Os extractos do HOAc foram combinados e liofilizados originando 329 mg do péptido em bruto.

O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente em nBuOH-HOAc-H₂O (4:1:5). As fracções apropriadas foram determinadas por TLC, reunidas, evaporadas até à secura e o resíduo foi liofilizado a partir de HOAc a 1%, produzindo 79 mg do péptido do título.

TLC: (B:E:A:W 1:1:1:1) R_F=0,46

HPLC: (Altex Ultrasphere C18, CH₃CN/H₂O/TFA a 0,1%, gradiente de 5-40% de CH₃CN, 15 min), k'=3,71.

FAB-MS: m/z 1003 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: (hidrólise em HCl/TFA 2:1 contendo 0,005% p/v de fenol a 160°C durante 1 hora): Asp, 1,00; Ser, 0,73; Glu, 0,98; Pro, 0,98; Val, 1,84; Tyr, 1,08; Arg, 0,99.

Exemplo 65

Preparação de Ac-Ala-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-Arg(Tos)-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisol, a 0°C durante 50 min. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc glacial. Os extractos do HOAc foram combinados e liofilizados originando 275 mg do péptido em bruto.

-112-

O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente em nBuOH-HOAc-H₂O (4:1:5). As fracções apropriadas foram determinadas por TLC, reunidas, evaporadas até à secura, e o resíduo liofilizado a partir de HOAc a 1%, produzindo 235 mg do péptido do título.

TLC: (B:E:A:W 1:1:1:1) $R_f=0,69$

HPLC: (Altex Ultrasphere C18, CH₃CN/H₂O/TFA a 0,1%, gradiente de 5-40% de CH₃CN, 15 min), $k'=4,48$.

FAB-MS: m/z 831 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: (hidrólise em HCl/TFA 2:1 contendo 0,005% p/v de fenol a 160°C durante 1 hora): Asp, 1,00; Ala, 0,99; Glu, 0,98; Pro, 0,95; Val, 1,97; Tyr, 1,85.

Exemplo 66

Preparação de Ala-Ala-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Boc-Ala-Ala-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisol, a 0°C durante 50 min. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc glacial. Os extractos de HOAc foram combinados e liofilizados originando 265 mg do péptido em bruto.

Uma alíquota de 75 mg do péptido em bruto foi purificada por filtração em gel numa coluna de 2,6 x 70 cm de Sephadex® G-15, utilizando HOAc a 1% como eluente. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 50 mg do péptido do título.

TLC: (B:A:W 1:1:1) $R_f=0,54$

HPLC: (Altex Ultrasphere C18, CH₃CN/H₂O/TFA a 0,1%, gradiente de 5-40% de CH₃CN, 15 min), $k'=4,67$.

FAB-MS: m/z 947 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: (hidrólise em HCl/TFA 2:1 contendo 0,005% p/v de fenol a 160°C durante 1 hora): Asp, 1,00; Ser, 0,61; Ala, 1,52; Glu, 0,99%; Pro, 0,86%; Val, 1,90; Tyr, 0,98.

-113-

Exemplo 67Preparação de Ac-Cys-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Cys(MBz)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisol, a 0°C durante 50 min. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc glacial. Os extractos do HOAc foram combinados e liofilizados originando 292 mg do péptido em bruto.

O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente em nBuOH-HOAc-H₂O (4:1:5). As fracções apropriadas foram determinadas por TLC, reunidas, evaporadas até à secura e o resíduo foi liofilizado a partir de HOAc a 1%, produzindo 188 mg do péptido do título.

TLC: (B:E:A:W 1:1:1:1) R_F=0,67

HPLC: (Altex Ultrasphere C18, CH₃CN/H₂O/TFA a 0,1%, gradiente de 5-40% de CH₃CN, 15 min), k'=3,7.

FAB-MS: m/z 863 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos (oxidação com ácido perbórmico a 0°C durante 4 horas seguida por hidrólise em HCl/TFA 2:1 contendo 0,005% p/v de fenol a 160°C durante 1 hora): Cys-SO₃H, 0,98; Asp, 1,03; Glu, 1,00; Pro, 1,13; Val, 1,94; Tyr, 1,78.

Exemplo 68Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Δ³-Pro-Val-Val-NH₂

Meia mmole da resina-péptidilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Δ³-Pro-Val-Val-BHA foi preparada como acima. O péptido foi clivado da resina por tratamento com 10 ml de HF/1 ml de anisol, a 0°C durante 50 min. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 4 x 20 ml de HOAc glacial. Os extractos do HOAc foram combinados e liofilizados originando 250 mg do péptido em bruto.

Uma alíquota de 100 mg do péptido em bruto foi purificada por filtração em gel numa coluna de 2,6 x 70 cm de Sephadex[®] G-15

utilizando HOAc 0,2 N como eluente. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 41 mg do péptido do título.

HPLC: (Altex Ultrasphere C18, CH₃CN/H₂O/TFA a 0,1%, gradiente de 10-40% de CH₃CN, 30 min), k'=3,00.

FAB-MS: m/z 803 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: (hidrólise em HCl/TFA 2:1 contendo 0,005% p/v de fenol a 160°C durante 1 hora): Asp, 1,00; Ser, 0,66; Glu, 0,95; Val, 1,88; Tyr, 0,95.

Exemplo 69

Preparação de Ac-Ser-Gly-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

A resina-péptidilo protegida Boc-Ser(Bzl)-Gly-Asn-Tyr-(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados originando 167 mg do produto em bruto. O péptido em bruto foi dissolvido em HOAc a 1% e purificado numa coluna de 2,6 x 70 cm de Sephadex[®] e liofilizadas, produzindo 138 mg do produto purificado.

HPLC: k' = 4,17 (Beckman Ultrasphere[®] ODS, CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

MS (FAB): m/z 776 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: Asp 1,00, Gly 1,03, Pro 0,90, Val 1,88, Tyr 0,80, Ser 0,68.

Exemplo 70

Preparação de 2-asparaginilamino-3-fenil-propil-prolilvalil valinamida

A resina-péptidilo protegida Boc-Asn-(2-amino-3-fenilpropil)-Val-Val-BHA foi preparada da forma usual, numa escala de 0,5 mmol, utilizando o composto do Exemplo 2(d) e o processo do Exemplo 15. O péptido foi desprotegido e removida da resina por tratamento com HF anidro (10 ml), em presença de anisol (1 ml), a 0°C

-115-

durante uma hora. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter etílico, seca ao ar e em seguida extraída com 2 x 30 ml de HOAc glacial. Os extractos do HOAc foram combinados e liofilizados, originando 139,6 mg do péptido em bruto. O péptido foi purificado por filtração em gel em Sephadex^R G-15 utilizando HOAc a 1% como eluente. As fracções apropriadas foram combinadas, produzindo 81,1 mg do péptido purificado, pico único por HPLC.

HPLC: (Hamilton PRP-1, 5-40% de CH₃CN/TFA a 0,1%, 15 min.)

k'=2,47

FAB-MS: m/z 560,5 (M+H)⁺.

Exemplo 71

Preparação de éster de metilo de (4S,5S) 5-amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)hexil-valil valina, cloridrato

Éster de metilo de (4S,5S) 5-(terc-butiloxicarbonil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-benziloxifenil-hexil-valil valina

a) A uma solução do composto do Exemplo 35(a) (1,08 g, 1,70 mmol) em MeOH, a 0°C, foi adicionado boro-hidreto de sódio (32 mg, 0,85 mmol) em fracções. Após 30, a reacção estava concluída tal como indicado pela TLC, foi diluída com HCl aquoso a 5% e extraída, três vezes, com CH₂Cl₂. Os extractos orgânicos combinados foram secos (MgSO₄), filtrados e evaporados sob pressão reduzida originando uma mistura de isómeros, como um sólido branco (1,05 g, 97%). Os isómeros foram eluídos através de uma coluna de sílica de HPLC de 2,54 x 25 cm com CH₂Cl₂:MeOH 40:1 a um fluxo de 20 ml/min. O isómero desejado (4S), que eluiu em primeiro lugar aos 14,5 min, foi recolhido e evaporado, originando o composto do título como um sólido branco (295 mg, 34%).

RMN (CDCl₃): δ 7,43 (5H, m), 7,02 (4H, dd), 6,40 (1H, d), 6,32 (1H, d), 5,04 (2H, s), 4,50 (2H, m), 4,26 (2H, m), 3,70 (3H, s), 2,71 (2H, m), 2,43 (2H, m), 2,11 (2H, m), 1,39 (9H, s), 0,91 (12H, m).

MS (FAB): m/z 642,4 (M+H)⁺.

-116-

Éster de metilo de (4S,5S) 5-amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-benziloxifenil)hexil-valil valina, cloridrato

b) O composto do Exemplo 71(a) (295 mg, 0,46 mmol) foi dissolvido em ácido trifluoroacético puro (1 ml) e agitado durante 3 min. A solução foi evaporada sob pressão reduzida, dissolvida em MeOH, tratada com HCl concentrado (3 gotas) e evaporada sob pressão reduzida, originando o composto do título como um sólido branco.

Exemplo 72

Preparação de éster de metilo de (4S,5S) 5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)hexil-valil valina, sal do ácido acético

Éster de metilo de (4S,5S)-5-(carbobenziloxialanilalanil)amino-6-(4-benziloxi)fenil-4-hidroxi-(1-oxo)hexil-valil valina

a) Uma solução de carbobenziloxialanilalanina (56 mg, 0,19 mmol) em THF foi arrefecida até -40°C sob uma atmosfera de argon. A esta solução foi adicionada N-metilmorfolina (28 ml, 0,251 mmol), seguida por cloroformato de isobutilo (25 mg, 0,19 mmol). A mistura reaccional foi agitada durante 15 min e mais N-metil morfolina (28 ml, 0,251 mmol) foi adicionada, seguida pelo composto do Exemplo 71(b) (100 mg, 0,173 mmol). A mistura resultante foi agitada durante 30 min a -40°C, aquecida até à temperatura ambiente e agitada durante 16 h. A mistura foi diluída com acetato de etilo:CH₂Cl₂ 1:1, e lavada sucessivamente com HCl aquoso a 5%, NaHCO₃ aquoso a 5% e NaCl saturado. A solução foi seca (MgSO₄), filtrada e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo sólido foi eluído através de uma coluna de gel de sílica de HPLC de 1" x 25 cm com CHCl₃:MeOH:H₂O 95:5:0,5 originando o composto do título como um sólido branco (96 mg, 77%)

RMN (CD₃OD/CDCl₃): δ 7,15 (10H, m), 6,80 (4H, dd), 4,90 (2H, s), 4,81 (2H, s), 3,90 (2H, q), 3,75 (1H, m), 3,51 (3H, s), 3,36 (1H, m), 2,59 (2H, m), 2,11 (2H, m), 1,88 (3H, m), 1,48 (2H, m), 1,10 (8H, m), 0,76 (12H, d).

MS (FAB): m/z 813,3 (M+H)⁺.

-117-

Éster de metilo de (4S,5S) 5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)hexil-valil valina, sal do ácido acético

b) A uma solução do composto do Exemplo 72(a) (90 mg, 0,11 mmol) em ácido acético foi adicionado paládio a 10% em carbono activado (90 mg). O gás hidrogénio foi borbulhado por meio de um balão de vidro através da solução, durante 60 min, sendo, em seguida, a mistura sob agitação mantida sob uma atmosfera de hidrogénio, durante 14 h. A suspensão foi filtrada através de uma almofada de Celite^R e evaporada sob pressão reduzida originando o composto do título como um sólido branco (74 mg, 98%)

RMN (CD₃OD/CDCl₃): δ 7,06 (1H, d), 6,78 (4H, dd), 4,29 (1H, d), 4,16 (1H, m), 4,03 (1H, d), 3,60 (3H, s), 2,62 (2H, m), 1,85 (7H, br m), 1,57 (2H, m), 1,16 (6H, m), 0,80 (12H, d).

MS(FAB): m/z 594,4 (M+H)⁺.

Exemplo 73

Preparação de éster de metilo de (4S,5S)-5-alanilamino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)-hexil-valil valina, sal de ácido acético

Éster de metilo de (4S,5S) 5-(carbobenziloxialanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-benziloxifenil)hexil-valil valina

a) Utilizando o processo do Exemplo 72(b), substituindo por carbobenziloxialanina (34 mg, 0,15 mmol) a carbobenziloxialanil alanina, e utilizando N-metilmorfolina (44 ml, 0,40 mmol; adicionada em duas porções iguais), cloroformato de isobutilo (20 ml, 0,15 mmol) e o composto do Exemplo 71(b) (79 mg, 0,137 mmol), foi preparado o composto do título. O produto em bruto foi purificado por cromatografia de coluna utilizando gel de sílica, eluindo com MeOH:CHCl₃ 5:95, para originar o composto do título como um sólido branco (60 mg, 82%).

RMN (CD₃OD/CDCl₃): δ 7,13 (10H, m), 6,81 (4H, dd), 4,92 (2H, s), 4,70 (2H, s), 4,21 (1H, m), 3,96 (2H, d), 3,76 (1H, m), 3,55 (3H, s), 3,34 (1H, m), 2,61 (2H, m), 2,12 (2H, m), 1,89 (3H, m), 1,48 (2H, m), 1,04 (4H, d), 0,71 (12H, d).

MS (FAB): m/z 747,3 (M+H)⁺.

-118-

Éster de metilo de (4S,5S)-5-alanilamino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)hexil-valil valina, sal de ácido acético

b) O composto do título foi produzido por um processo idêntico ao do Exemplo 72(b), substituindo pelo composto do Exemplo 73(a) (60 mg) o composto do Exemplo 72(a), originando o composto do título como um sólido branco (52 mg, 100%).

RMN ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$): δ 8,19 (1H, d), 7,95 (1H, d), 7,70 (1H, d), 6,78 (4H, dd), 4,15 (2H, m), 3,95 (1H, m), 3,73 (1H, q), 3,58 (3H, s), 3,43 (1H, m), 2,66 (2H, m), 2,21 (2H, t), 1,90 (3H, m), 1,53 (2H, q), 1,36 (3H, d), 1,17 (2H, br), 0,93 (2H, m), 0,78 (12H, d).

MS (FAB): m/z 523,2 ($M+H$)⁺.

Exemplo 74

Preparação de éster de metilo de (4S,5S) 5-(terc-butiloxycarbonil-alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)hexil-valil valina

O composto do título foi preparado por um processo idêntico ao do Exemplo 72(a), substituindo por t-butiloxycarbonilalanina (52 mg, 0,275 mmol) a carbobenziloxialanil alanina, e utilizando o composto do Exemplo 71(b) (144 mg, 0,25 mmol), N-metil morfina (79 ml, 0,724 mmol; em duas porções) e cloroformato de isobutilo (36 ml, 0,275 mmol). O produto em bruto foi purificado por eluição através de uma coluna de gel de sílica com $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:25 até um sólido branco (55 mg, 55%). Uma porção deste produto (12,5 mg, 0,0172 mmol) foi agitada em ácido acético com paládio a 10% em carbono activado (10 mg). O gás hidrogénio foi borbulhado através da solução, por meio de um balão de vidro, durante 60 min sendo, em seguida, a mistura mantida sob uma pressão de hidrogénio positiva durante 14 h. A suspensão foi filtrada através de uma almofada de Celite^R e evaporada sob pressão reduzida, originando o composto do título como um sólido branco (7,5 mg, 70%).

RMN ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$): δ 6,72 (4H, dd), 4,23 (1H, d), 3,65-3,92 (3H, m), 3,54 (3H, s), 3,38 (2H, m), 2,60 (2H, m), 1,62-2,20 (5H, m), 1,49 (3H, m), 1,26 (9H, s), 1,04 (5H, m), 0,77 (12H, d).

MS (FAB): m/z 623,3 ($M+H$)⁺.

Exemplo 75

Preparação de éster de metilo de (4S,5S) 5-((β -alanil)alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)hexil-valil valina, cloridrato

Éster de metilo de (4S,5S) 5-((carbобензилоxi- β -alanil)alanil)-amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)hexil-valil valina

a) A uma solução de carbобензилоxi- β -alanina (23 mg, 0,105 mmol), e hidroxibenzotriazol (26 mg, 0,19 mmol) em DMF (0,8 ml), foi adicionada diciclo-hexilcarbodiimida (22 mg, 0,105 mmol) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 20 min. A esta solução foi adicionada N-metilmorfolina (32 ml, 0,29 mmol) e o composto do Exemplo 73(b) (50 mg, 0,0956 mmol). A solução foi deixada sob agitação à temperatura ambiente durante 6 dias e foi, em seguida, diluída com CHCl_3 e lavada sucessivamente com HCl a 10%, NaHCO_3 aquoso a 5% e H_2O . A camada orgânica foi seca (MgSO_4), filtrada e evaporada sob pressão reduzida até um sólido branco (44 mg). O produto foi eluído através de uma coluna de sílica de HPLC de 2,54 x 25 cm com $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ 6:96 originando o composto do título como um sólido branco (12 mg, 20%).

RMN ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$): δ 7,51 (1H, d), 7,30 (1H, d), 7,18 (5H, br s), 6,94 (1H, d), 6,69 (4H, dd), 4,90 (2H, s), 4,19 (1H, m), 3,82 (1H, m), 3,56 (3H, s), 3,42 (1H, m), 3,18 (3H, m), 2,59 (2H, m), 2,15 (4H, m), 1,90 (2H, m), 1,49 (2H, m), 1,08 (3H, d), 0,80 (12H, d).
MS (FAB): m/z 728,3 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Éster de metilo de (4S,5S) 5-((β -alanil)alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)hexil-valil valina, cloridrato

b) A uma solução do composto do Exemplo 75(a) (11 mg, 0,015 mmol) em MeOH, foi adicionado paládio a 10% em carbono ativado (5 mg). O gás hidrogénio foi borbulhado através da solução, por meio de um balão de vidro, durante 1 h, e, em seguida, a mistura sob agitação foi mantida sob hidrogénio ($1,013 \times 10^5$ Pa) durante 14 h. A suspensão foi filtrada através de uma almofada de Celite[®], e foram adicionadas diversas gotas de HCl concentrado. A solução foi evaporada sob pressão reduzida originando o composto

-120-

do título como um sólido branco (10 mg, 95%).

RMN ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$): δ 7,60 (1H, d), 6,59 (4H, dd), 4,06 (1H, t), 3,89 (2H, m), 3,66 (1H, m), 3,44 (3H, s), 3,27 (1H, m), 2,72 (2H, m), 2,41 (5H, m), 1,98 (2H, t), 1,79 (3H, m), 1,32 (2H, m), 1,07 (1H, m), 0,94 (3H, d), 0,67 (12H, d).

Exemplo 76

Preparação de éster de metilo de (4S,5S) 5-amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina, cloridrato

Éster de metilo de (4S,5S)-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina

a) A uma solução do composto do Exemplo 34(a) (4,59 g, 8,61 mmol) em MeOH (150 ml), a 0°C, foi adicionado boro-hidreto de sódio (0,33 g, 8,7 mmol). A mistura resultante foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e foi agitada durante 30 min. A mistura foi vertida em HCl a 5% (500 ml) e extraída com CH_2Cl_2 (3 x 100 ml). Os extractos orgânicos combinados foram secos (MgSO_4), filtrados e evaporados sob pressão reduzida, originando uma mistura de estereoisómeros. O resíduo foi dissolvido em MeOH a 2%/ CHCl_3 (70 ml), filtrado e purificado em lotes por HPLC utilizando uma coluna de sílica de 5,08 x 25 cm e eluindo com MeOH a 2%/ CHCl_3 . O isómero desejado (4S) eluiu primeiro, foi recolhido e evaporado sob pressão reduzida, originando o composto do título (1,23 g, rendimento de 27%).

RMN (CDCl_3): δ 7,27 (5H, m), 6,94 (1H, d), 6,76 (1H, d), 5,10 (1H, d), 4,51 (1H, dd), 4,36 (1H, br t), 3,74 (3H, s), 3,70-3,50 (3H, m), 2,89 (2H, d), 2,40 (2H, m), 2,24-2,00 (2H, m), 1,95-1,65 (2H, m), 1,38 (9H, s), 0,91 (12H, m).

MS (FAB): m/z 536,2 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Éster de metilo de (4S,5S) 5-amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina, cloridrato

b) O péptido do Exemplo 76(a) (1,0 g, 1,87 mmol) foi tratado com ácido trifluoroacético (5 ml), e a mistura resultante foi agitada durante 10 min. Foi adicionado metanol (25 ml), se-

-121-

guido por HCl conc. (0,20 ml). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida; foi adicionado Et₂O ao resíduo e reevaporado, produzindo o composto do título como um pó branco o qual foi utilizado sem purificação ulterior.

RMN (CD₃OD): δ 7,30 (5H, m), 4,26 (2H, m), 3,69 (3H, s), 3,60 (1H, m), 3,34 (1H, m), 3,07 (1H, dd), 2,88 (1H, dd), 2,40 (2H, m), 2,08 (2H, m), 1,80 (2H, m), 0,94 (12H, m).

MS (FAB): m/z 436,2 (M+H)⁺.

Exemplo 77

Preparação de (4S,5S) 5-(alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina, sal de ácido acético do éster de metilo

Éster de metilo de (4S,5S) 5-(carbobenziloxialanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina

a) A uma solução de carbobenziloxialanina (413 mg, 1,85 mmol) em THF anidro (5 ml) a -40°C sob uma atmosfera de argon foi adicionada N-metil morfolina (0,24 ml, 2,2 mmol), seguida por clo roformato de isobutilo (0,240 ml, 1,85 mmol). Após agitação durante 20 minutos, foi adicionada mais N-metilmorfolina (0,24 ml, 2,2 mmol), seguida por uma solução do composto do Exemplo 76(b) (0,83 g, 1,76 mmol) em THF (10 ml). A mistura resultante foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e agitada durante toda a noite. A mistura reaccional foi dissolvida em EtOAc, e lavada sucessivamente com HCl a 10%, NaHCO₃ aquoso a 5% e H₂O, e, em seguida, seca (MgSO₄). A filtração e a remoção do solvente in vacuo originaram um sólido branco, o qual foi purificado por cromatografia flash eluindo com um gradiente de solvente de 4 a 10% de MeOH/CHCl₃ (0,975 g, rendimento de 86%).

RMN (CD₃OD): δ 7,34 (5H, m), 7,23 (5H, m), 5,09 (2H, s), 4,32 (1H, d), 4,19 (1H, d), 4,09 (2H, m), 3,71 (3H, s), 3,60 (1H, m), 2,85 (2H, m), 2,30 (2H, m), 2,10 (2H, m), 1,70 (2H, m), 1,23 (3H, d), 0,94 (12H, m).

MS(FAB): m/z 641,3 (M+H)⁺.

(4S,5S) 5-(alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina, sal do ácido acético do éster de metilo

b) A uma solução do composto do Exemplo 77(a) (969 mg, 1,51 mmol) em MeOH:HOAc 1:1 (15 ml) foi adicionado paládio a 10% em carbono activado (100 mg). O gás hidrogénio foi introduzido na mistura, a qual foi, em seguida, mantida sob uma atmosfera de hidrogénio durante 18 h. A mistura reaccional foi filtrada através de uma almofada de Celite® e evaporada sob pressão reduzida originando o composto do título como um sólido branco (0,84 g, rendimento de 98%).

RMN (CD₃OD): δ 7,25 (5H, m), 4,32 (1H, d), 4,21 (1H, d), 4,10 (1H, br t), 3,77 (1H, q aparente), 3,71 (3H, s), 3,60 (1H, br t), 2,96 (1H, dd), 2,83 (1H, dd), 2,35 (2H, t), 2,08 (2H, m), 1,96 (3H, s), 1,70 (2H, m), 1,44 (3H, d), 0,95 (12H, d).

MS (FAB): m/z 507,2 (M+H)⁺.

Exemplo 78

Preparação de éster de metilo de (4S,5S) 5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina

Éster de metilo de (4S,5S) 5-(carbobenziloxialanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina

a) A uma solução de carbobenziloxialanina (337 mg, 1,51 mmol) e N-metil morfolina (0,198 ml, 1,80 mmol) em THF anidro (10 ml), a -40°C sob uma atmosfera de árgon, foi adicionado cloroformato de isobutilo (0,196 ml, 1,51 mmol) durante um período de 10 min. Após agitação durante mais 20 min, mais N-metil morfolina (0,198 ml, 1,80 mmol) foi adicionada seguida por uma solução do composto do Exemplo 77(b) (0,84 g, 1,48 mmol) em THF (20 ml). Foi adicionada dimetilformamida (10 ml) e o banho de temperatura fria foi removido brevemente para facilitar a agitação. A mistura reaccional foi re-arrefecida para -40°C, deixada aquecer gradualmente até à temperatura ambiente e agitada durante toda a noite. A mistura reaccional foi dissolvida em MeOH a 10%/CHCl₃ (500 ml) e lavada sucessivamente com H₂O (200 ml), HCl a 10% (200 ml) e H₂O (200 ml). O extracto orgânico foi evaporado sob pressão reduzida

-123-

e o resíduo foi dissolvido em $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 80:20:2 (22 ml). A solução foi purificada, em três porções, por cromatografia flash, eluindo com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 90:10:1, originando o produto em bruto com um sólido branco-sujo (950 mg). Este material foi dissolvido em MeOH a 5%/CHCl₃ (75 ml), filtrado e adicionalmente purificado em fracções de 8 ml cada por HPLC utilizando uma coluna de sílica de 1" x 25 cm eluindo com MeOH a 5%/CHCl₃, originando o composto do título como um sólido branco (721 mg, rendimento de 68%).

RMN ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$): δ 7,35 (5H, m), 7,22 (5H, m), 5,12 (2H, d), 4,36 (1H, d), 4,29 (1H, q), 4,16 (2H, m), 4,05 (1H, m), 3,73 (3H, s), 3,57 (1H, m), 2,92 (1H, dd), 2,81 (1H, dd), 2,32 (2H, m), 2,09 (2H, m), 1,72 (2H, m), 1,36 (3H, d), 1,27 (3H, d), 0,94 (12H, 2 d em sobreposição).

MS (FAB): m/z 712,4 ($M+H$)⁺.

Éster de metilo de (4S,5S) 5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina

b) A uma solução do composto do Exemplo 78(a) (715 mg, 1,01 mmol) em MeOH (45 ml) foi adicionado paládio a 10% em carbono activado (100 mg). O gás hidrogénio foi introduzido na mistura reaccional a qual foi, em seguida, mantida sob uma atmosfera de hidrogénio durante 48 h. A mistura foi filtrada, e o solvente foi removido in vacuo, originando o composto do título como um sólido branco (599 mg, rendimento de 100%).

RMN (CD_3OD): δ 7,24 (5H, m), 4,32 (2H, m), 4,21 (1H, d), 4,03 (1H, br t), 3,94 (1H, q), 3,71 (3H, s), 3,59 (1H, br t), 2,86 (2H, 2 dd em sobreposição), 2,31 (2H, t), 2,07 (2H, m), 1,68 (2H, m), 1,52 (3H, d), 1,32 (3H, d), 0,94 (12H, d em sobreposição).

MS (FAB): m/z 578,3 ($M+H$)⁺.

Exemplo 79

Preparação de éster de metilo de (4S,5S) 5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-ciclo-hexil-hexil-valil valina

A uma solução do composto do Exemplo 78(b) (5,4 mg, 9,4 mmol) em MeOH (5 ml) foi adicionado PtO_2 (10 mg), e a mistura resultante foi agitada num hidrogenador de Parr a $4,14 \times 10^5$ Pa de

-124-

H₂ durante 2 d. A mistura foi filtrada e o solvente foi removido in vacuo, originando o composto do título como um sólido branco (3,4 mg, rendimento de 62%).

RMN (CD₃OD): δ 4,42-4,15 (3H, m), 3,97 (2H, m), 3,71 (3H, s), 3,52 (1H, m), 2,35 (2H, t), 2,10 (2H, m), 1,85 (1H, br d), 1,80-1,15 (21H, m), 1,65 (12H, m).

MS (FAB): m/z 584,4 (M+H)⁺.

Exemplo 80

Preparação de éster de metilo de (4S,5S) 5-(serilalanilalanil)-amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina, sal do ácido acético

Éster de metilo de (4S,5S) 5-(carbobenziloxi-(0-fenilmetil)serilalanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina

a) A uma solução de carbobenziloxi-(0-benzil)serina (311 mg, 0,945 mmol) e N-metil morfolina (130 ml, 1,20 mmol) em THF (20 ml, a -40°C, foi adicionado cloroformato de isobutilo (123 ml, 0,945 mmol) durante um período de 10 min. Após agitação durante mais 30 min, foi adicionado o composto do Exemplo 78(b) (520 mg, 0,900 mmol) em DMF a 20%/THF (25 ml). A mistura resultante foi deixada aquecer lentamente até à temperatura ambiente e foi agitada durante 20 h. A mistura foi diluída com CHCl₃ (150 ml) e lavada com H₂O (2x). O extracto orgânico foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo sólido (870 mg) foi purificado por cromatografia flash, eluindo com MeOH a 10%/CHCl₃, originando material o qual era ainda ligeiramente impuro (640 mg). O produto foi dissolvido em MeOH a 4%/CHCl₃ (20 ml), filtrado e adicionalmente purificado por HPLC, em 6 fracções, utilizando uma coluna de sílica de 2,54 x 25 cm eluindo com MeOH a 4%/CH₂Cl₂ para originar o composto do título como um sólido branco (414 mg, rendimento de 52%).

RMN (CD₃OD/CDCl₃): δ 7,10 (10H, m), 7,01 (5H, m), 4,94 (2H, s), 4,35 (2H, s), 4,25-3,80 (6H, m), 3,55 (2H, m), 3,52 (3H, s), 3,38 (1H, m), 2,73 (1H, dd), 2,63 (1H, dd), 2,10 (2H, m), 1,90 (2H, m), 1,57 (2H, m), 1,17 (3H, d), 0,93 (3H, d), 0,73 (12H, d em sobrepo

sição).

MS (FAB): m/z 889,4 (M+H)⁺.

Éster de metilo de (4S,5S) 5-[(0-fenilmetil)serilalanilalanil]-amino-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina, sal de ácido acético

b) A uma mistura do composto do Exemplo 80(a) (409 mg, 0,461 mmol) em MeOH:HOAc 2:1 (15 ml), foi adicionado paládio a 10% em carbono activado (80 mg). O gás hidrogénio foi introduzido na mistura reaccional, a qual foi, em seguida, mantida sob uma atmosfera de hidrogénio durante 16 h. A mistura foi filtrada através de Celite[®], e evaporada sob pressão reduzida, originando o composto do título como um sólido branco (353 mg, rendimento de 94%)

RMN (CDCl₃): δ 7,31 (5H, m), 7,24 (5H, m), 4,58 (2H, s), 4,42-4,18 (4H, m), 4,05 (1H, m), 3,94 (1H, m), 3,85-3,70 (2H, m), 3,70 (3H, s), 3,58 (1H, m), 2,91 (1H, dd), 2,81 (1H, dd), 2,30 (2H, m), 2,12 (2H, m), 1,98 (3H, s), 1,72 (2H, m), 1,37 (3H, d), 1,22 (3H, d), 0,94 (12H, m).

MS (FAB): m/z 755,3 (M+H)⁺.

Éster de metilo de (4S,5S) 5-(serilalanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina, sal de ácido acético

c) A uma solução do composto do Exemplo 80(c) (353 mg, 0,46 mmol) em MeOH (20 ml) foi adicionado paládio a 10% em carbono activado (85 mg). O gás hidrogénio foi introduzido na mistura, a qual foi, em seguida, mantida sob uma atmosfera de hidrogénio durante 2 dias. Foi adicionado ácido acético (5 ml), seguido por mais Pd a 10%/C (150 mg). Após agitação durante mais 4 dias sob uma atmosfera de hidrogénio, a mistura reaccional foi filtrada através de Celite[®], e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, originando o composto do título (273 mg, rendimento de 88%).

RMN (CD₃OD): δ 7,23 (5H, m), 4,43-4,18 (4H, m), 4,05 (1H, br t), 3,85 (2H, m), 3,70 (3H, s), 3,59 (2H, m), 2,92 (1H, dd), 2,80 (1H, dd), 2,30 (2H, m), 2,07 (2H, m), 1,96 (3H, s), 1,71 (2H, m), 1,40 (3H, d), 1,25 (3H, d), 0,94 (12H, m).

MS (FAB): m/z 665,3 (M+H)⁺.

-126-

Exemplo 81

Preparação de éster de metilo de (4S,5S) 5-[(D-seril)alanilalanil]amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina

Éster de metilo de (4S,5S) 5-((carbobenziloxi-D-seril)alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina

a) A uma solução de carbobenziloxi-D-serina (8,4 mg, 35 mmol) e hidroxibenzotriazol (9,5 mg, 70 mmol) em DMF (8 gotas, foi adicionada diciclo-hexilcarbodiimida (7,2 mg, 35 mmol), e a mistura resultante foi agitada durante 20 min. Foi adicionado o composto do Exemplo 78(b) (20 mg, 35 mmol), seguido por mais DMF (7 gotas), e a mistura foi agitada durante 2 dias. A mistura foi diluída com MeOH a 10%/CHCl₃ e lavada sucessivamente com HCl a 10%, NaHCO₃ aquoso a 5% e H₂O. O solvente foi removido in vacuo e o resíduo foi purificado por cromatografia flash, eluindo com MeOH a 10%/CHCl₃, para originar o composto do título (4,2 mg, rendimento de 14%).

RMN (CDCl₃)CD₃OD): δ 7,26 (5H, s), 7,17 (5H, m), 5,11 (1H, d), 4,96 (1H, d), 4,35-4,10 (5H, m), 3,96 (1H, m), 3,83 (1H, dd), 3,72 (1H, dd), 3,64 (3H, s), 3,47 (1H, m), 2,87 (1H, dd), 2,72 (1H, dd), 2,34-1,95 (4H, m), 1,70 (2H, m), 1,34 (3H, d), 1,24 (3H, d), 0,87 (12H, d).

MS (FAB): m/z 799,5 (M+H)⁺.

Éster de metilo de (4S,5S) 5-((D-seril)alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina

b) A uma solução do composto do Exemplo 81(a) (3,9 mg, 4,9 mmol) em MeOH (2 ml), foi adicionado paládio a 10% em carbono activado (2 mg). O gás hidrogénio foi introduzido na mistura reaccional, a qual foi, em seguida, mantida sob uma atmosfera de hidrogénio durante 2 d. A mistura foi filtrada através de Celite® e evaporada sob pressão reduzida, originando o composto do título como um sólido branco (3,4 mg, rendimento de 98%).

RMN (CD₃OD): δ 7,22 (5H, m), 4,25 (4H, m), 4,05 (1H, m), 3,82 (2H, m), 3,69 (3H, s), 3,55 (1H, m), 2,90 (1H, dd), 2,78 (1H, dd), 2,29 (2H, br t), 2,05 (2H, m), 1,69 (2H, m), 1,37 (3H, d), 1,25

-127-

(3H, d), 0,92 (12H, d em sobreposição).

MS (FAB): m/z 665,4 ($M+H$)⁺.Exemplo 82Preparação de éster de benzilo de (4RS,5S) 5-amino-6-(4-benziloxi)fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina, cloridratoÉster de benzilo de (5S) 6-(4-benziloxi)fenil-5-(t-butiloxicarbonil)amino-(1,4-dioxo)hexil-valil valina

a) A uma solução do composto do Exemplo 13(c) (43 mg, 0,10 mmol) em THF, a -40°C sob uma atmosfera de árgon, foi adicionada N-metil morfolina (16 ml, 0,14 mmol), seguida por cloroformato de isobutilo (13 ml, 0,10 mmol). Após agitação durante 15 min, foi adicionada mais N-metil morfolina (16 ml, 0,14 mmol), seguida por cloridrato de éster de benzilo de valil valina (51 mg, 0,15 mmol). A mistura resultante foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e agitada durante toda a noite. A mistura reaccional foi diluída com HCl a 5% e extraída com $CHCl_3$ (3x). Os extractos orgânicos combinados foram evaporados e o resíduo foi purificado por cromatografia flash eluindo com MeOH: $CHCl_3$ 1:25, originando o composto do título como um sólido branco (62 mg, rendimento de 100%).

RMN ($CDCl_3$): δ 7,34 (10H, m), 7,07 (2H, d), 6,89 (2H, d), 6,52 (1H, d), 6,31 (1H, d), 5,2 (1H, m), 5,16 (2H, dd), 5,02 (2H, s), 4,59 (1H, dd), 4,49 (1H, dd), 4,30 (1H, dd), 3,08 (1H, dd), 2,84 (3H, m), 2,46 (2H, m), 2,13 (2H, m), 1,86 (1H, br s), 1,39 (9H, s), 0,91 (12H, m).

Éster de benzilo de (4RS,5S) 6-(4-benziloxi)fenil-5-(t-butiloxicarbonil)amino-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina

b) A uma solução do composto do Exemplo 82(a) (61 mg, 0,10 mmol) em MeOH: CH_2Cl_2 5:1 (6 ml) foi adicionado boro-hidreto de sódio (5 mg, 0,13 mmol) e a mistura resultante foi agitada durante 20 min. A mistura reaccional foi diluída com HCl aquoso a 5% e extraída, diversas vezes, com CH_2Cl_2 . Os extractos orgânicos combinados foram secos ($MgSO_4$), filtrados e evaporados sob pressão reduzida, originando o composto do título como um sólido

branco (61 mg, rendimento de 100%).

RMN ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): δ 7,35 (10H, m), 7,12 (2H, d), 6,90 (2H, d), 5,17 (2H, dd), 5,02 (2H, s), 4,47 (1H, m), 4,17 (1H, t aparente), 3,68 (1H, m), 3,53 (1H, m), 2,96-2,55 (2H, m), 2,36 (2H, m), 2,19 (1H, m), 2,10-1,81 (2H, m), 1,70 (1H, m), 1,35 (9H, 2 singuletos), 0,91 (12H, m).

MS (FAB): m/z 718,5 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Éster de benzilo de (4RS,5S) 5-amino-6-(4-benziloxi)fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina, cloridrato

c) A uma mistura do composto do Exemplo 82(b) (60 mg, 97 μmol) em CH_2Cl_2 (2 ml), foi adicionado ácido trifluoroacético (0,5 ml), e a solução resultante foi agitada durante 2 h. Foi adicionado metanol, seguido por HCl concentrado (2 gotas), e a solução foi evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi triturado com Et_2O , originando o composto do título como um sólido branco (56 mg, rendimento de 100%).

RMN (CD_3OD): δ 7,36 (10H, m), 7,20 (2H, d), 6,97 (2H, d), 5,15 (2H, m), 5,07 (2H, s), 4,34 (1H, m), 4,21 (1H, m), 3,84-3,53 (1H, m), 3,44-3,20 (1H, m), 2,97 (1H, m), 2,80 (1H, m), 2,44 (2H, m), 2,15 (1H, m), 2,02 (1H, m), 1,94-1,62 (2H, m), 0,94 (12H, m).

Éster de benzilo de (4RS,5S) 5-amino-6-(4-hidroxi)fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina, cloridrato

c) O composto do Exemplo 82(c) (50 mg) foi dissolvido em ácido acético e agitado com paládio a 10% em carbono activado (50 mg). O gás hidrogénio foi borbulhado através da solução durante 2 h, e a reacção foi agitada durante 20 h sob uma atmosfera de hidrogénio. A suspensão foi filtrada através de uma almofada de Celite® e evaporada sob pressão reduzida, originando o composto do título.

Exemplo 83

Preparação de (4RS,5S) 5-(serilalanilalanil)amino-6-(4-hidroxi)fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina, cloridrato

Éster de benzilo de (4RS,5S) 5- $\square$ (t-butiloxicarbonil-(0-fenilme-

til)serilalanilalanil)-amino-6-(4-benziloxi)fenil-4-hidroxi-1-
-oxo-hexil-valil valina

a) A uma solução de t-butiloxicarbonil-(O-benzil)serilalanil alanina (46,8 mg, 107 μ mol) em THF (1 ml), a -40°C sob uma atmosfera de árgon, foi adicionada N-metil morfolina (16,5 ml, 150 μ mol), seguida por cloroformato de isobutilo (13,8 ml, 107 μ mol). Após agitação durante 15 min, foi adicionada mais N-metil morfolina (16,5 ml, 150 μ mol), seguida por uma solução do composto do Exemplo 82(c) (56 mg, 97 μ mol) em THF (0,75 ml). A mistura resultante foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e agitada durante toda a noite. A mistura reaccional foi diluída com HCl a 5% e extraída, diversas vezes, com CH_2Cl_2 . Os extractos orgânicos combinados foram evaporados sob pressão reduzida, e o resíduo sólido foi purificado por cromatografia flash, eluindo com $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ 1:9, originando o composto do título (79,5 mg, rendimento de 87%).

RMN ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): δ 7,32 (15H, m), 7,14 (2H, m), 6,84 (2H, m), 5,16 (2H, dd), 5,00 (2H, d), 4,56-4,40 (2H, 2d), 4,21-3,53 (9H, m), 3,10-2,65 (2H, m), 2,48-2,28 (2H, m), 2,25-2,0 (2H, m), 1,96-1,68 (2H, m), 1,50 (9H), 1,39 (3H, d's em sobreposição), 1,17 (3H, 2d's), 0,96 (12H, m).

MS (FAB): m/z 1037,4 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

(4RS,5S) 5-(t-butiloxicarbonilserilalanilalanil)amino-6-(4-hidroxi)fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina

b) A uma solução do composto do Exemplo 83(a) (79 mg, 76 μ mol), preparada acima, em $\text{MeOH}:\text{HOAc}$ 3:1 (5 ml), foi adicionado paládio a 10% em carbono activado (45 mg). Foi introduzido hidrogénio na mistura, a qual foi então mantida sob $1,013 \times 10^5$ Pa de H_2 durante 24 h. A mistura reaccional foi filtrada através de uma almofada de Celite[®] e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia flash eluindo com um gradiente de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{HCO}_2\text{H}$ de 90:10:1:1 a 80:20:2:1, para originar o composto do título com um sólido branco (37,5 mg, rendimento de 64%).

RMN (CD_3OD): δ 7,03 (2H, m), 6,66 (2H, m), 4,4-4,05 (5H, m), 4,03-3,50 (4H, m), 3,06-2,54 (2H, m), 2,38 (2H, m), 2,14 (2H, m), 1,96-1,62 (2H, m), 1,48 (9H), 1,38 (3H, m), 1,22 (3H, 2d's), 0,96 (12H, d).

MS(FAB): m/z 767,3 ($M+H$)⁺.

(4RS,5S) 5-(serilalanilalanil)amino-6-(4-hidroxi)fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina, cloridrato

c) O composto do Exemplo 83(b) (5,9 mg, 7,7 mmol) foi tratado com ácido trifluoroacético (0,25 ml), e a solução resultante foi agitada durante 90 min. Foi adicionado metanol, seguido por HCl concentrado (1 gota) e a mistura foi evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi triturado com Et_2O , originando o composto do título como um pó branco.

RMN (CD_3OD): δ 7,03 (2H, m), 6,68 (2H, m), 4,42-4,17 (5H, m), 3,92 (4H, m), 3,04-2,54 (2H, m), 2,33 (2H, m), 2,22-1,97 (2H, m), 1,95-1,55 (2H, m), 1,35 (3H, d em sobreposição), 1,26 (3H, d em sobreposição), 0,98 (12H, m).

MS (FAB): m/z 667,4 ($M+H$)⁺.

Exemplo 84

Preparação de (4RS,5S) 5-(t-butiloxicarbonilserilalanilalanil)amino-4-hidroxi-6-(4-hidroxi)fenil-1-oxo-hexil-valil amida

(5S) 6-(4-benziloxi)fenil-5-(t-butiloxicarbonil)amino-1,4-dioxo-hexil-valil amida

a) A uma solução do composto do Exemplo 13(c) (25 mg, 58,5 μmol) em THF, a -40°C sob uma atmosfera de árgon, foi adicionada N-metil morfolina (9,9 μl , 90 μmol), seguida por cloroformato de isobutilo (7,6 ml, 58,5 mmol). Após agitação durante 15 min, foi adicionada valinamida (14 mg, 120 mmol) e a mistura resultante foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e agitada durante toda a noite. A mistura reaccional foi diluída com HCl a 5% e extraída, três vezes, com CHCl_3 . O solvente foi removido in vacuo e o resíduo foi purificado por cromatografia flash eluindo com $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ 1:9, para originar o composto do título como um sólido amarelo (23,5 mg, rendimento de 75%).

-131-

RMN ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$): δ 7,36 (5H, m), 7,12 (2H, d), 6,91 (2H, d), 5,05 (2H, s), 4,33 (1H, m), 4,22 (1H, m), 3,07 (1H, dd), 2,83 (3H, m), 2,52 (2H, t), 2,13 (1H, septeto), 1,39 (9H, s), 0,97 (6H, d em sobreposição).

(4RS,5S) 6-(4-benziloxi)fenil-5-(t-butiloxicarbonil)amino-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil amida

b) A uma solução do composto do Exemplo 84(a) (23 mg, 44 mmol), preparada acima, em $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 1:4 (2,5 ml) foi adicionado NaBH_4 (3 mg, 80 mmol). Após agitação durante 15 min, a mistura foi diluída com HCl a 5% e extraída, diversas vezes, com CH_2Cl_2 . Os extractos orgânicos combinados foram lavados com H_2O e secos (MgSO_4). A filtração e a remoção do solvente in vacuo forneceram o composto do título como um sólido branco (23 mg, rendimento de 100%).

RMN ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$): δ 7,36 (5H, m), 7,13 (2H, d), 6,90 (2H, d), 5,04 (2H, s), 4,20 (1H, t aparente), 3,67 (1H, m), 3,53 (1H, m), 3,02-2,30 (4H, m), 2,10 (1H, m), 2,02-1,61 (2H, m), 1,35 (9H, 2 singuletos), 0,97 (6H, d em sobreposição).

MS (FAB): m/z 528,3 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

(4RS,5S)-6-(4-benziloxi)fenil-5-amino-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil amida, cloridrato

c) O composto do Exemplo 84(b) (22 mg, 42 mmol) foi dissolvido em ácido trifluoroacético puro (0,1 ml). Após 1 h, foi adicionado metanol, seguido por HCl conc. (2 gotas). A remoção do solvente in vacuo originou o composto do título como um sólido higroscópico (22 mg).

RMN (CD_3OD): δ 7,35 (5H, m), 7,20 (2H, 2 dupletos), 6,98 (2H, 2 dupletos), 5,07 (2H, s), 4,21 (1H, m), 3,83-3,53 (1H, m), 3,47-3,21 (1H, m), 2,98 (1H, m), 2,81 (1H, m), 2,43 (2H, m), 2,09 (1H, m), 1,98-1,62 (2H, m), 0,98 (6H, m).

(4RS,5S) 5-(t-butiloxicarbonil-(O-fenilmetil)serilalanilalanil)-amino-6-(4-benziloxi)fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil amida

d) A uma solução de t-butiloxicarbonil-(O-fenilmetil)-serilalanil alanina (20 mg, 46 mmol) em THF (1 ml), a -40°C sob

-132-

uma atmosfera de árgon, foi adicionada N-metil morfolina (8,2 ml, 75 mmol), seguida por cloroformato de isobutilo (6,0 ml, 46 mmol). A mistura resultante foi agitada durante 15 min, e foi adicionada mais N-metil morfolina (8,2 ml, 75 mmol), seguida por uma solução do composto do Exemplo 84(c) (22 mg) em THF (0,8 ml). A mistura resultante foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e agitada durante toda a noite. A mistura reaccional, a qual solidificou durante a noite, foi dissolvida em CHCl_3 :MeOH 1:1 e lavada com HCl a 5%. O extracto orgânico foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo (51 mg) foi dissolvido em CHCl_3 :MeOH:ácido acético 9:1:0,5 (2 ml), aplicado a uma coluna de sílica flash de 15,24 x 15 mm e eluído com CHCl_3 :MeOH 9:1, originando um sólido amarelo (19,5 mg). A HPLC analítica (sílica; fase móvel CH_2Cl_2 :MeOH 9:1; detector 275 nm) indicou uma proporção de 2:1 dos diastereómeros do hidroxil na posição 4. A purificação adicional foi realizada por cromatografia flash em sílica utilizando CHCl_3 :MeOH:H₂O 80:20:2, para produzir o composto do título (13,8 mg, rendimento de 39%) como um sólido branco.

RMN ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$): δ 7,32 (10H, m), 7,12 (2H, m), 6,82 (2H, m), 5,00 (2H, s), 4,19 (5H, m), 4,00 (1H, m), 3,68 (5H, m), 3,10-2,60 (2H, m), 2,42 (2H, m), 2,13 (1H, m), 1,99-1,63 (2H, m), 1,50 (9H, s), 1,37 (3H, d em sobreposição), 1,12 (3H, d), 0,95 (6H, m).

MS (FAB): m/z 847,5 ($M+H$)⁺.

(4RS,5S) 5-(t-butiloxicarbonilserilalanilalanil)amino-4-hidroxi-6-(4-hidroxi)fenil-1-oxo-hexil-valil amida

e) A uma solução do composto do Exemplo 84(d) (13,8 mg, 16,3 mmol), preparado cima, em MeOH (5 ml) foi adicionado paládio a 10% em carbono activado (7 mg). O gás hidrogénio foi borbulado na mistura resultante a qual foi, em seguida, mantida a $1,013 \times 10^5$ Pa de H₂ durante 24 h. A filtração e a evaporação do solvente sob pressão reduzida forneceram o composto do título como um sólido branco (10,7 mg, rendimento de 99%).

RMN (CD_3OD): δ 7,05 (2H, 2 dupletos), 6,64 (2H, 2 dupletos), 4,18 (5H, m), 3,95 (1H, m), 3,88-3,67 (3H, m), 3,60 (1H, m),

-133-

3,09-2,53 (2H, m), 2,37 (2H, m), 2,11 (1H, m), 2,00-1,65 (2H, m), 1,47 (9H, 2s), 1,38 (3H, d em sobreposição), 1,21 (3H, 2 dupletos), 0,95 (6H, m).

MS (FAB): m/z 667,2 (M+H)⁺.

Exemplo 85

Preparação de éster de metilo de (1R,2R)-2-(((1S,2S)-1-hidroxi-2-amino-3-ciclo-hexil)propil)ciclopentanocarbonil-valil valina, cloridrato

Éster de metilo de (1R,2R) 2-(((1S,2S)-1-hidroxi-2-t-butiloxicarbonilamino-3-fenil)propil)-ciclopentanocarbonil-valil valina

a) Utilizando o processo do Exemplo 27(a), o composto do Exemplo 6(b) (54 mg, 150 μ mol) reagiu com N-hidroxibenzotriazol (40 mg, 300 μ mol), DCC (33 mg, 170 μ mol), N-metil morfolina (40 μ l, 380 μ mol) e cloridrato de éster de metilo de valil valina (80 mg, 300 μ mol), para originar o composto do título.

Éster de metilo de (1R,2R) 2-(((1S,2S)-1-hidroxi-2-t-butiloxicarbonilamino-3-ciclo-hexil)propil)-ciclopentanocarbonil-valil valina

b) Uma solução do composto do Exemplo 85(a) (10 mg, 17,4 mmol) em MeOH (3 ml) foi agitada com PtO₂ (10 mg) num hidrogenador de Parr a $4,14 \times 10^5$ Pa H₂. Após 26 h, a mistura foi filtrada através de uma almofada de Celite® e evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia flash eluindo com CHCl₃:MeOH 25:1, para originar o composto do título (9 mg, rendimento de 89%).

RMN (CDCl₃): δ 6,58 (1H, d), 6,44 (1H, d), 4,68 (1H, d), 4,51 (1H, dd), 4,23 (1H, br t), 3,74 (3H, s), 3,60 (1H, m), 3,47 (1H, m), 2,68 (1H, br t), 2,39-2,02 (4H, m), 2,0-1,5 (12H, m), 1,45 (9H, s), 1,40-1,08 (6H, m), 0,94 (12H, m).

Éster de metilo de (1R,2R)-2-(((1S,2S)-1-hidroxi-2-amino-3-ciclo-hexil)propil)ciclopentanocarbonil-valil valina, cloridrato

c) O composto do Exemplo 85(b) (9 mg, 15,5 mmol) foi dissolvido em ácido trifluoroacético puro, e agitado durante diversos min. A solução foi evaporada sob pressão reduzida, o resíduo

foi dissolvido em MeOH, e tratado com HCl concentrado. A remoção do solvente in vacuo originou o composto do título.

Exemplo 86

Preparação de éster de metilo de (1R,2R) 2-(((1S,2S)-1-hidroxi-2-(serilalanilalanil)amino-3-ciclo-hexil)propil)ciclopentanocarbonil-valil valina, cloridrato

Éster de metilo de (1R,2R) 2-(((1S,2S)-1-hidroxi-2-(t-butiloxi-carbonil-(O-fenilmetil)serilalanilalanil)amino-3-ciclo-hexil)propil)ciclopentanocarbonil-valil valina

a) A uma solução de t-butiloxi-carbonil-(O-benzil)serilalanil alanina (6,6 mg, 15 mmol) em THF (0,5 ml), a -40°C sob uma atmosfera de argon, foi adicionada N-metil morfolina (2,2 ml, 20 mmol), seguida por cloroformato de isobutilo (2,0 ml, 15 mmol). A mistura resultante foi agitada durante 15 minutos, e mais N-metil morfolina (2,2 ml, 20 mmol) foi adicionada, seguida por uma solução do composto do Exemplo 85(c) (15 mmol) em THF (0,5 ml). A mistura resultante foi deixada aquecer até à temperatura ambiente, e foi agitada durante toda a noite. A mistura foi dividida entre EtOAc e HCl diluído. O extracto orgânico foi lavado com NaHCO₃ aquoso, NaCl aquoso saturado, e seco (MgSO₄). A filtração e a remoção do solvente in vacuo originou um sólido branco (12 mg). O produto foi purificado por cromatografia flash eluindo com CHCl₃:MeOH 25:1, para originar o composto do título como um vidro incolor (6,2 mg, rendimento de 46%),

RMN (CDCl₃): δ 7,35 (5H, m), 7,0-6,6 (5H, m), 5,49 (1H, br d), 4,54 (2H, s), 4,52-4,08 (5H, m), 3,99 (1H, br), 3,78 (2H, m), 3,72 (3H, s), 3,42 (1H, br t), 2,71 (1H, m), 2,20 (4H, m), 1,95-1,55 (12H, m), 1,46 (9H, s), 1,40 (6H, d), 1,35-1,06 (6H, m), 0,94 (12H, m).

Éster de metilo de (1R,2R) 2-(((1S,2S)-1-hidroxi-2-(t-butiloxi-carbonilserilalanil-alanil)amino-3-ciclo-hexil)propil)ciclopentanocarbonil-valil valina

b) A uma solução do composto do Exemplo 86(a) (6,2 mg, 6,9 mmol) em MeOH (1 ml) foi adicionado paládio a 10% em carbono

ativado (5 mg). O gás hidrogênio foi introduzido na mistura reaccional, a qual foi, em seguida, mantida sob $1,013 \times 10^5$ Pa de H_2 durante 6 h. A mistura foi filtrada através de uma almofada de Celite® e o solvente foi removido in vacuo, originando o composto do título como um vidro incolor (6 mg).

RMN ($CDCl_3/CD_3OD$): δ 4,43 (1H, d), 4,38-4,05 (4H, m), 3,85 (2H, m), 3,73 (3H, s), 3,62 (1H, m), 3,45 (1H, m), 2,68 (1H, m), 2,30-2,05 (4H, m), 1,9-1,55 (12H, m), 1,46 (9H, s), 1,40 (6H, d em so breposição), 1,35-1,10 (6H, m), 0,94 (12H, m).

MS (FAB): m/z 811,5 ($M+H$)⁺.

Éster de metilo de (1R,2R) 2-(((1S,2S)-1-hidroxi-2-(serilalanil-alanil)amino-3-ciclo-hexil)propil)ciclopentanocarbonil-valil valina, cloridrato

c) O composto do Exemplo 86(b) (6 mg, 7 mmol) foi dissolvido em algumas gotas de ácido trifluoroacético. Após agitação à temperatura ambiente durante 40 min, a solução foi eluída com MeOH e foi adicionada uma gota de HCl conc./dioxano. A mistura resultante foi evaporada sob pressão reduzida originando o composto do título.

RMN (CD_3OD): δ 4,50-4,15 (4H, m), 3,93 (4H, m), 3,71 (3H, s), 3,45 (1H, t), 2,65 (1H, m), 2,29 (1H, m), 2,2-2,0 (3H, m), 1,93-1,53 (12H, m), 1,5-1,1 (6H, m), 1,41 (3H, d), 1,35 (3H, d), 0,96 (12H, m).

MS (FAB): m/z 711,5 ($M+H$)⁺.

Exemplo 87

Preparação de (4S,5S)-5-(metoxycarbonil-alanilalanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-(1-oxo)hexil-valil valina

Éster de benzilo de (5S)-5-(terc-butiloxycarbonil)amino-6-fenil-(1,4-dioxo)hexil-valil valina

a) A uma solução de ácido (5S)-5-(terc-butiloxycarbonil)-amino-4-oxo-6-fenil-hexanóico (16 mg, 0,500 mmol) e N-metil morfina (66 μ l, 0,60 mmol) em THF (4 ml) a -40°C, foi adicionado clo roformato de isobutilo (65 μ l, 0,50 mmol), durante um período de 5 minutos. Após agitação durante mais 5 min, mais N-metil morfo-

-136-

lina (66 μ l) foi adicionada, seguida por cloridrato de éster de benzilo de valil valina (205 mg, 0,60 mmol) em DMF (1,5 ml). A mistura resultante foi deixada aquecer lentamente até à temperatura ambiente e foi agitada durante 15 h. A mistura foi diluída com CHCl_3 e lavada com HCl a 10% e, em seguida, H_2O . O extracto orgânico foi evaporado sob pressão reduzida, e o resíduo foi purificado por cromatografia flash (CHCl_3 :MeOH 25:1), originando o composto do título como um sólido branco (253 mg, rendimento de 85%).

Éster de benzilo de (4S,5S)-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-4-hidroxi-6-fenil-(1-oxo)hexil-valil valina

b) O produto do Exemplo 87(a) (253 mg, 0,415 mmol) foi dissolvido em 5 ml de MeOH, e foi adicionado NaBH_4 (17 mg, 0,45 mmol). Após 20 min de agitação, a mistura foi diluída com HCl a 5% e extraída com CH_2Cl_2 . O solvente foi removido e o resíduo foi purificado por HPLC em sílica eluindo com MeOH a 2% em CH_2Cl_2 para fornecer o composto do título (75,6 mg), o qual eluiu primeiro, seguido por o diastereómero (4R) correspondente (135 mg).

Cloridrato de éster de benzilo de (4S,5S)-5-amino-4-hidroxi-6-fenil-(1-oxo)hexil-valil valina

c) O produto do Exemplo 87(b) (75 mg) foi dissolvido em TFA (0,5 ml). Após 5 min, foi adicionado MeOH (2 ml) seguido por HCl conc. (50 μ l). A solução foi concentrada até uma goma, triturada com éter e seca, para originar um pó branco (70 mg).

Éster de benzilo de (4S,5S)-5-(metoxicarbonil-alanilalanil)amino-4-hidroxi-6-fenil-(1-oxo)hexil-valil valina

d) A uma solução de metoxicarbonilalanil alanina (29,7 mg, 0,136 mmol) e N-metilmorfolina (17 μ l, 0,15 mmol) em THF (2 ml), a -40°C , foi adicionado cloroformato de isobutilo (17,6 μ l, 0,136 mmol), durante um período de 5 min. Após agitação, durante 15 min adicionais, foi adicionada mais N-metil morfolina (17 μ l), seguida por uma solução de cloridrato de éster de benzilo de (4S,5S)-5-amino-4-hidroxi-6-fenil-(1-oxo)hexil-valil valina (68 mg, 0,124 mmol) em THF:DMF 2:1 (1,5 ml). A mistura resultante

-137-

foi deixada aquecer lentamente até à temperatura ambiente e foi agitada durante 15 h. A mistura foi diluída com CHCl_3 :MeOH 9:1, e lavada com HCl a 10% seguido por H_2O . O extracto orgânico foi evaporado sob pressão reduzida, originando o composto do título como um sólido branco (95 mg).

TLC (CHCl_3 :MeOH 9:1): $R_f = 0,5$.

RMN ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$): δ 7,4-7,25 (10H, m), 5,17 (2H, dd), 4,45 (1H, obsc.), 4,30 (1H, m), 4,18-4,00 (3H, m), 3,69 (3H, s), 3,56 (1H, m), 2,88 (2H, ddd), 2,32 (2H, m), 2,19 (1H, m), 2,03 (1H, m), 1,72 (2H, m), 1,34 (3H, d), 1,28 (3H, d), 0,91 (12H, d em sobreposição).

MS (FAB): m/z 712,4 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

(4S,5S)-5-(metoxicarbonil-alanilalanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-(1-oxo)hexil-valil valina

e) A uma mistura do produto do Exemplo 87(d) (85 mg, 0,12 mmol) em MeOH (5 ml), foi adicionado paládio a 10% em carbono activado (13 mg). O gás hidrogénio foi introduzido na mistura reaccional, a qual foi então mantida sob uma atmosfera de hidrogénio durante 3,5 h. A mistura foi filtrada através de Celite® e evaporada sob pressão reduzida, originando o composto do título como um sólido branco (70,5 mg, rendimento de 95%).

RMN (CD_3OD): δ 7,23 (5H, m), 4,37-4,00 (5H, m), 3,66 (3H, s), 3,58 (1H, m), 2,88 (2H, ddd), 2,32 (2H, m), 2,18 (1H, m), 2,06 (1H, m), 1,73 (2H, m), 1,32 (3H, d), 1,26 (3H, d), 0,95 (12H, m).

MS (FAB): m/z 622,3 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Exemplo 88

Preparação de (4S,5S)-5-(carbобензилокси-alanilalanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-(1-oxo)hexil-valil valinol

A uma solução do éster de metilo de (4S,5S)-5-(carbобензилокси-alanilalanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-(1-oxo)hexil-valil valina foi adicionado LiBH_4 em excesso (cerca de 5 mg). Após 10 min, a solução foi diluída com HCl a 5%, e extraída com CHCl_3 :MeOH 9:1. A camada orgânica foi lavada com água e concentrada.

-138-

O resíduo foi purificado por cromatografia flash (CHCl_3 :MeOH 9:1), originando o composto do título (1,9 mg) como um sólido branco.

RMN: ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$): δ 7,2-7,0 (10H, m), 4,93 (2H, d), 4,1 (1H, obsc.), 4,00-3,80 (3H, m), 3,50-3,35 (4H, m), 2,68 (2H, ddd), 2,13 (2H, m), 1,92 (1H, m), 1,69 (1H, m), 1,54 (2H, m), 1,16 (3H, d), 1,08 (3H, d), 0,75 (12H, m).

MS (FAB): m/z 684,3 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Exemplo 89

Preparação de (4S,5S)-5-(4S,5S) 5-(carbobenziloxialanilalanil)-
-amino-4-hidroxi-6-fenil-(1-oxo)hexil-valina isobutilamida

Éster de benzilo do ácido (5S)-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-4-
-oxo-6-fenil-hexanóico

a) A uma solução de ácido (5S)-5-(terc-butiloxicarbonil)-amino-4-oxo-6-fenil-hexanóico (1 mmol) em acetonitrilo seco (10 ml), foi adicionado DBU (1 mmol), seguido por brometo de benzilo (1,5 mmol) com agitação. Após 2 h, a mistura foi diluída com HCl a 5% e extraída com CH_2Cl_2 . A camada orgânica foi concentrada, e o resíduo foi purificado por cromatografia flash (CHCl_3), originando o éster (370 mg).

RMN (CDCl_3): δ 7,4-7,0 (10H, m), 5,10 (2H, s), 5,03 (1H, d), 4,51 (1H, q), 3,18-2,83 (2H, m), 2,73 (2H, m), 2,60 (2H, m), 1,39 (9H, s).

MS (FAB): m/z 412 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Éster de benzilo do ácido (4S,5S)-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-
-4-(terc-butildimetilsiloxi)-6-fenil-hexanóico

b) O produto do Exemplo 89(a) foi reduzido com NaBH_4 em MeOH pelo processo do Exemplo 87(b) (rendimento de 96-98%). A mistura de álcoois diastereomérica em bruto resultante foi dissolvida em DMF a uma concentração de cerca de 2M, e foram adicionados imidazol (2,4 equiv.) e cloreto de terc-butildimetilsililo (1,2 equiv.). A mistura foi agitada durante 2 dias, em seguida foi diluída com água e extraída com acetato de etilo. A camada orgânica foi seca (MgSO_4) e concentrada. O resíduo foi purifica-

-139-

do por cromatografia flash (hexano:EtOAc 5:1), seguida por HPLC (hexano:EtOAc 15:1), fornecendo o composto do título (rendimento de 25%), o qual eluiu primeiro, seguido pelo éster de benzilo (4R)-siloxi correspondente (rendimento de 70%).

isómero (4S):

RMN (CDCl_3): δ 7,4-7,12 (10H, m), 5,08 (2H, s), 4,67 (1H, d), 3,85 (1H, q), 3,68 (1H, m), 2,72 (2H, m), 2,36 (2H, m), 1,78 (2H, m), 1,41 (9H, s), 0,88 (9H, s), 0,10 (6H, d).

MS (FAB): m/z 529 ($M+H$)⁺.

Ácido (4S,5S)-5-(terc-butiloxycarbonil)amino-4-(terc-butildimetil-siloxi)-6-fenil-hexanóico

c) A hidrogenólise do produto do Exemplo 89(c), pelo processo do Exemplo 87(e), forneceu o composto do título (rendimento de 99%), como uma espuma quebradiça.

RMN (CDCl_3): δ 7,35-7,10 (5H, m), 4,69 (2H, br d), 3,88 (1H, q), 3,70 (1H, m), 2,72 (2H, m), 2,31 (2H, m), 1,78 (2H, m), 1,30 (9H, s), 0,89 (9H, s), 0,10 (6H, d).

MS (FAB): m/z 438,2 ($M+H$)⁺.

(4S,5S)-5-(carbobenziloxialanilalanil)amino-4-(terc-butildimetil-siloxi)-6-fenil-(1-oxo)hexil-valina isobutilamida

d) O produto do Exemplo 89(c) foi acoplado com cloridrato de valina isobutilamida pelo processo do Exemplo 87(a), originando a (4S,5S)-5-(terc-butiloxycarbonil)amino-4-(terc-butildimetilsiloxi)-6-fenil-hexanoil-valina isobutilamida em bruto (rendimento de 80%), a qual foi directamente convertida no cloridrato correspondente pelo processo do Exemplo 87(c). O cloridrato em bruto foi, por sua vez, acoplado à carbobenziloxialanina pelo processo em 1-passo, seguido por cromatografia flash (CHCl_3 :MeOH 20:1), originando o composto do título (rendimento de 60%) como um sólido branco.

RMN (CDCl_3): δ 7,45-7,10 (10H, m), 6,38 (1H, m), 5,08 (2H, m), 4,21 (2H, m), 3,70 (1H, m), 2,73 (2H, m), 2,33 (1H, m), 2,12 (2H, m), 1,25 (4H, m), 0,91 (22H, m), 0,10 (6H, d).

MS (FAB): m/z 697,3 ($M+H$)⁺.

-140-

(4S,5S)-5-(carbobenziloxialanilalanil)amino-4-hidroxi-6-fenil-
-(1-oxo)hexil-valina isobutilamida

e) Ao produto do Exemplo 89 (d) em THF foi adicionado brometo de tetrabutilamônio (5 equiv.). Após agitação durante 14 h, a mistura foi diluída com água e extraída com diclorometano. A remoção do solvente originou o composto do título como um sólido branco.

RMN (CDCl_3) CD_3OD): δ 7,28-7,05 (10H, m), 4,96 (2H, s), 4,02-3,76 (4H, m), 3,47 (1H, m), 2,9-2,60 (4H, m), 2,13 (2H, m), 1,82 (1H, q), 1,55 (3H, m), 1,09 (4H, d), 0,70 (12H, d).

MS (FAB): m/z 583,3 ($M+H$)⁺.

Exemplo 90

Preparação de éster de metilo do ácido (4RS,5S)-5-((terc-butilo-
xicarbonil)isoleucil)amino-7-metil-4-hidroxi-1-oxo-octil-leucil-
-aspártico

Ácido (5S)-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-7-metil-4-oxo-octanóico

a) O composto do título foi preparado pelo processo dos Exemplos 12(a,b), excepto pela utilização de Boc-leucina N-metoxi-N-metil amida em vez de Boc-fenilalanina N-metoxi-N-metil amida.

RMN (CDCl_3): δ 5,0 (1H, d), 4,35 (1H, m), 3,5 (1H, s), 2,8 (2H, m), 2,6 (3H, t), 1,5 (9H, s), 0,90 (8H, d).

Éster de metilo do ácido (5S)-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-7-
-metil-(1,4)-dioxo-octil-leucil-(O-benzil)aspártico

b) O composto do título foi preparado pelo processo de acoplamento do Exemplo 34(a), utilizando o produto do Exemplo 90(a) e cloridrato de éster de metilo de ácido leucil-(O-benzil)-aspártico.

Éster de metilo do ácido (4RS,5S)-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-
-7-metil-4-hidroxi-1-oxo-octil-leucil-(O-benzil)aspártico

c) O produto do Exemplo 90(b) foi reduzido com NaBH_3CN em excesso em ácido acético (2 dias), originando o composto do título como uma mistura 1:1 dos diastereómeros 4R e 4S, após tra-

balho aquoso e cromatografia flash.

RMN (CDCl_3): δ 7,35 (5H, s), 7,05 (1H, d), 6,15 (1H, m), 5,15 (2H, s), 4,85 (2H, m), 4,55 (1H, d), 4,4 (1H, m), 3,65 (3H, s), 2,9 (2H, m), 2,4 (2H, t), 1,5 (9H, s), 0,90 (12H, m).

MS (FAB): 622,3 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Éster de metilo do ácido (4RS,5S)-5-((terc-butiloxicarbonil)isoleucil)amino-7-metil-4-hidroxi-1-oxo-octil-leucil-(O-benzil)aspártico

d) O composto do título foi preparado a partir do produto do Exemplo 90(c) pelos processos dos Exemplos 76(b) e 77(a), excepto pela substituição por Boc-isoleucina em lugar da Cbz-alanina.

RMN (CDCl_3): δ 7,4 (5H, s), 7,0 (1H, d), 6,3 (0,5H, d), 6,2 (0,5H, d), 5,15 (2H, s), 5,05 (2H, m), 4,9 (1H, m), 4,5 (1H, m), 3,7 (3H, d), 3,0 (2H, m), 2,45 (3H, m), 1,5 (15H, s), 1,3 (15H, s), 0,90 (19H, m).

MS (FAB): 735,5 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Éster de metilo do ácido (4RS,5S)-5-((terc-butiloxicarbonil)isoleucil)amino-7-metil-4-hidroxi-1-oxo-octil-leucil-aspártico

e) O composto do título foi preparado a partir do produto do Exemplo 90(d) pelo processo do Exemplo 77(b).

RMN: δ 4,55 (1H, t), 4,35 (1H, m), 3,8 (2H, m), 3,65 (3H, s), 3,45 (1H, m), 2,7 (1H, m), 2,5 (1H, m), 2,3 (2H, m), 1,4 (9H, s), 1,2 (6H, s), 0,90 (15H, m).

MS (FAB): 667,4 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺; 643,4 ($\text{M}-\text{H}$)⁻.

Exemplo 91

Preparação de (4R,5S) e (4S,5R)-carbобенziloxi-alanil-(3-hidroxi-5-amino-6-fenil)hexanoil-valil-(4-aminometil)piridina

Boc-valil-(4-aminometil)piridina

a) Boc-L-valina (5,0 g, 23 mmol) foi dissolvida em 100 ml de CH_2Cl_2 em conjunto com 4-amino-metilpiridina (2,5 g, 23 mmol). Foi adicionada diciclo-hexilcarbodiimida (4,75 g, 23 mmol) e a reacção foi deixada sob agitação durante toda a noite. A mis

-142-

tura reaccional foi filtrada, lavada com NaHCO_3 1 N (3 x 50 ml), água (1 x 50 ml) e seca sobre Na_2SO_4 . O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi triturado com hexano filtrado e cristalizado. O produto parcialmente purificado foi purificado pela sua passagem sobre um leito de gel de sílica em acetato de etilo. A evaporação do solvente originou 3,64 g do produto como um sólido branco.

RMN (CDCl_3): δ 0,83 (d), 0,90 (6H, d), 1,30 (9H, s), 3,8-4,0 (1H, dd), 4,38 (2H, d), 5,2 (1H, d), 7,1 (d), 8,5 (4H, d).

(5S)-carbобензилокси-аланил-(4-оксо-5-амино-6-фенил)гексаноил-валил-(4-аминометил)пиридина

b) Boc-L-valil-(4-aminometil)piridina (2,0 g) foi tratada com HCl 4 N/dioxano, à temperatura ambiente durante 30 min, evaporado até à secura e o resíduo dissolvido em água, filtrado e liofilizado, originando o sal dicloridrato de L-valil-(4-aminometil)piridina.

O sal dicloridrato de L-valil-(4-aminometil)piridina (0,16 g, 0,5 mmol) e ácido Boc-4-oxo-5(S)-amino-6-fenil-hexanóico foram dissolvidos em 10 ml de DMF. A isto foi adicionado hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfónio (0,322 g, 0,75 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (0,101 g, 0,75 mmol) e diisopropiletilamina (0,097 g, 0,75 mmol) e a mistura reaccional foi agitada durante toda a noite à temperatura ambiente. Mais hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfónio (0,332 g, 0,75 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (0,101 g, 0,75 mmol) e diisopropiletilamina (0,097 g, 0,75 mmol) foram adicionados e a reacção foi deixada prosseguir durante mais 24 horas à temperatura ambiente. Após evaporação do solvente, a mistura reaccional foi dissolvida em acetato de etilo, lavada com K_2CO_3 a 10%, NaHSO_4 saturado e água, seca sobre Na_2SO_4 e concentrada até um óleo. A purificação em gel de sílica utilizando metanol a 5%/cloroeto de metileno originou 99 mg de (4S) Boc-(3-oxo-4-amino-5-fenil)hexanoil-valil-(4-aminometil)piridina.

A (5S) Boc-(4-oxo-5-amino-6-fenil)hexanoil-valil-(4-aminometil)piridina, precedente, foi tratada com HCl 4 N/dioxano à tem

-143-

peratura ambiente durante 30 min, evaporada até à secura e o resíduo foi dissolvido em água, filtrado e liofilizado, originando 70 mg do sal dicloridrato de (5S)(3-oxo-5-amino-6-fenil)hexanoil-valil-(4-aminometil)piridina.

O sal dicloridrato de (5S)(3-oxo-5-amino-6-fenil)hexanoil-valil-(4-aminometil)piridina (67 mg, 0,15 mmol) foi dissolvido em DMF em conjunto com carbobenziloxi-L-alanina (51 mg, 0,23 mmol), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfónio (102 mg, 0,23 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (31 mg, 0,23 mmol) e diisopropiletilamina (30 mg, 0,23 mmol) e a reacção foi agitada à temperatura ambiente durante toda a noite. A mistura reaccional foi evaporada, dissolvida em acetonitrilo e purificada por HPLC preparativa num Beckman Ultrasphere® ODS utilizando um gradiente de 10% de acetonitrilo-água-TFA a 0,1% a 50% de acetonitrilo-água-TFA a 0,1%, durante 30 min a 4 ml/min. As fracções apropriadas foram reunidas, evaporadas até à secura e liofilizadas a partir de ácido acético a 1%, originando 29 mg do produto desejado.

FAB-MS m/z 616,2 ($M+H$)⁺, 614,2 ($M-H$)⁻.

(3R,4S) e (3S,4R)-carbobenziloxi-alanil-(3-hidroxi-4-amino-5-fenil)hexanoil-valil-(4-aminometil)piridina

c) (4S) carbobenziloxi-alanil-(3-oxo-4-amino-5-fenil)hexanoil-valil-(4-aminometil)-piridina (14) (20 mg, 0,33 mmol) foi dissolvida em 5 ml de metanol e boro-hidreto de sódio (1,4 mg, 0,036 mmol) foi adicionado. Após 30 minutos à temperatura ambiente, 1 mg adicional de boro-hidreto de sódio foi adicionado e a reacção foi deixada prosseguir durante mais 30 minutos à temperatura ambiente. O solvente foi removido por evaporação e o resíduo dissolvido em ácido acético e liofilizado. A mistura de álcoois diastereomérica foi separada por HPLC preparativa num Beckman Ultrasphere® ODS utilizando 28,5% de acetonitrilo-71,5% de água-TFA a 0,1%. As fracções apropriadas foram reunidas, evaporadas até à secura e liofilizadas a partir de ácido acético a 1%, originando 7 mg do isómero A e 6 mg do isómero B.

-144-

Isômero A:

FAB-MS m/z 618,5 ($M+H$)⁺, 616,4 ($M-H$)⁻.HPLC: $k' = 9,6$ (Beckman Ultrasphere[®] ODS utilizando um gradiente de 10% de acetonitrilo-água-TFA a 0,1% a 50% de acetonitrilo-água-TFA a 0,1% durante 30 min).

Isômero B:

FAB-MS m/z 618,5 ($M+H$)⁺, 616,4 ($M-H$)⁻.HPLC: $k' = 9,9$ (Beckman Ultrasphere[®] ODS utilizando um gradiente de 10% de acetonitrilo-água-TFA a 0,1% a 50% de acetonitrilo-água-TFA a 0,1% durante 30 min).Exemplo 92Preparação de (3S)-Boc-valil-4-metil-3-aminopentano-2-onaBoc-L-valina N,O-dimetilamida

a) Cloridrato de dimetil-hidroxilamina (3,91 g, 40 mmol) foi dissolvido em 25 ml de CH_2Cl_2 e arrefecido até 0°C. Foi adicionada trietilamina (4,14 g, 40 mmol) originando uma suspensão espessa, a qual foi deixada aquecer até à temperatura ambiente. Foi dissolvida Boc-L-valina (8,68 g, 40 mmol) em 50 ml de THF e 180 ml de CH_2Cl_2 , e arrefecida até -20°C. Foi adicionada N-metilpiperidina (4,88 ml, 40 mmol), seguida por cloroformato de etilo (4,34 g, 40 mmol). Após 5 minutos, a solução de dimetil-hidroxilamina foi adicionada e a reacção foi deixada aquecer até à temperatura ambiente. Após 3 horas, a mistura reaccional foi lavada com HCl 1 N (2 x 100 ml), NaOH 1 N (2 x 100 ml), seca sobre Na_2SO_4 e evaporada até um óleo incolor, o qual foi utilizado sem purificação posterior.

3(S)-4-metil-3-t-butiloxycarbonilaminopentano-2-ona

b) Boc-L-valina N,O-dimetilamida (2,6 g, 10 mmol) foi dissolvida em 30 ml de éter dietílico e adicionada, gota a gota, a 17 ml de uma solução 3 M de brometo de metilmagnésio em éter dietílico (51 mmol). A mistura reaccional foi agitada durante 3 horas à temperatura ambiente e, em seguida, vertida em água gelada, acidificada até pH 2 com HCl 1 N e extraída com acetato de etilo (3 x 50 ml). Os extractos foram secos sobre Na_2SO_4 e concentra

-145-

dos até um óleo incolor, o qual foi purificado por cromatografia em gel de sílica, utilizando metanol a 2%/CH₂Cl₂, para originar 1,74 g do produto desejado.

RMN (CDCl₃): δ 0,82 (3H, d), 1,05 (3H, d), 1,45 (9H, s), 2,2 (3H, s) 4,3 (1H, m), 5,25 (1H, br d).

(3S)-Boc-valil-4-metil-3-aminopentano-2-ona

c) 4-Metil-3(S)-t-butiloxycarbonilaminopentano-2-ona é agitada com HCl 4 N/dioxano, à temperatura ambiente durante 30 min, concentrada sob alto vácuo e, em seguida, evaporada de CH₂Cl₂, diversas vezes, para remover o HCl residual. O sal cloridrato resultante é dissolvido em CH₂Cl₂ e neutralizado com um equivalente de trietilamina. Boc-L-valina (um equiv.) e diciclo-hexilcarbodiimida (um equiv.) são adicionadas e a reação é agitada à temperatura ambiente durante toda a noite. A mistura reaccional é filtrada, lavada com Na₂CO₃ 1 N, seca sobre Na₂SO₄ e concentrada, produzindo o dipéptido em bruto, o qual é então purificado por cromatografia em gel de sílica.

(4S,5S)-benziloxycarbonilalanil-alanil-(6-fenil-5-amino-4-hidroxi-hexanoil)-valil-(4-metil-3(S)-aminopentano-2-ona)

d) O composto do Exemplo 92(c) é tratado com HCl 4 N/dioxano, à temperatura ambiente durante 30 min, concentrado sob alto vácuo e evaporado de CH₂Cl₂, diversas vezes, para remover o HCl residual, produzindo a (3S) valil-4-metil-3-aminopentano-2-ona, cloridrato. Substituindo, por este composto, a valina isobutilamida no processo do Exemplo 89, obteve-se o composto do título.

Exemplo 93

Preparação de ácido (5S) Boc-5-amino-6-fenil-trans-hex-3-enóico
ácido monometil trans-3-hexenóico

a) Diazald® (21,4 g, 100 mmol) foi dissolvido em éter e adicionado, gota a gota, a uma solução de KOH (5 g), água (8 ml) e éter (25 ml), a 65°C. O diazometano resultante foi destilado directamente numa solução de ácido β-trans-hidromucónico (10 g, 69 mmol). A solução foi evaporada e o resíduo purificado por cro

matografia flash em gel de sílica utilizando ácido acético a 23/
/clorofórmio, para originar 1,24 g do produto desejado.

RMN (CDCl_3): δ 10,85 (1H, s), 5,75 (2H, m), 3,68 (3H, s), 3,23
(4H, m).

6-(2-oxo-4-(fenilmetil)-3-oxazolidinil)-trans-hex-3-enoato de
(4S)-metilo

b) O ácido monometil trans-3-hexenóico (1,24 g, 7,8 mmol)
foi dissolvido em 50 ml de THF em conjunto com trietilamina (1,42
ml, 10,2 mmol) e foi arrefecido até -78°C . Cloreto de pivaloil
(1,06 ml, 8,6 mmol) foi adicionado, a reacção foi agitada durante
15 min a -78°C , e deixada aquecer até 0°C durante 45 min.

(S)-Benziloxazolidinona (2,5 g, 14,1 mmol) foi dissolvida
em 30 ml de THF e arrefecida até -78°C sob árgon. Foi adicionado
butillítio (5,6 ml de 2,5 M em hexano), lentamente, e a mistura
foi agitada durante 5 min. O anidrido misto precedente foi arre-
fecido até -78°C e a oxazolidinona litiada foi adicionada por meio
de uma cânula. A reacção foi agitada, a -78°C , durante 15 min e,
em seguida, deixada aquecer até à temperatura ambiente durante 1,5
hora. A reacção foi rapidamente extinguida com 100 ml de NaHSO_4
1 M e o THF foi removido sob pressão reduzida. O resíduo aquoso
foi extraído com CH_2Cl_2 e os extractos combinados foram lavados
com NaHSO_4 0,25 M, secos sobre MgSO_4 e evaporados até à secura. O
produto em bruto foi purificado por cromatografia flash em gel de
sílica em acetato de etilo a 30%/hexano, originando 1,40 g do pro-
duto desejado.

RMN (CDCl_3): δ 7,3 (5H, m), 5,8 (2H, m), 4,7 (1H, m), 4,2 (2H, d),
3,62 (3H, s), 3,1 (6H, m).

FAB-MS, m/z 318 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

6-(2-oxo-4-(fenilmetil)-3-oxazolidinil)-5-(fenilmetil)-trans-hex-
-3-enoato de (4S,5S)-metilo

c) A oxazolidinona do Exemplo 93(b) (3,9 mmol) foi dis-
solvida em 50 ml de THF, e arrefecida até -78°C . Foi adicionado
hexametildi-silazeto de potássio (7,8 ml de 0,5 M em THF, 3,9
mmol), e a mistura foi agitada a -78°C durante 15 min. Bromito

-147-

de benzilo (0,93 ml, 7,8 mmol) foi adicionado, e a mistura foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e agitada durante toda a noite. A mistura reaccional foi concentrada, e o resíduo purificado por cromatografia de gravidade em gel de sílica, utilizando acetato de etilo a 20%/hexano, para produzir 0,38 g do produto desejado (e 0,09 g do isómero 5(R))

RMN (CDCl_3): δ 7,27 (1H, m), 7,0 (2H, m), 5,73 (2H, m), 4,75 (3H, m) 4,05 (2H, m), 3,60 (3H, s), 3,0 (7H, m).

FAB-MS: m/z 408 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

5-(fenilmetil)-trans-hex-3-enoato de (5S)-monometilo

d) A oxazolidinona alquilada do Exemplo 93(c) (0,38 g, 0,93 mmol) foi dissolvida em 13,9 ml de THF e 4,6 ml de água, e foi arrefecida até 0°C. Foi adicionado peróxido de hidrogénio (0,63 ml de solução a 30%), seguido por hidróxido de lítio (78,1 mg, 2 equiv.). Após agitação a 0°C durante 30 min, a reacção foi rapidamente extinguida pela adição de 4,5 ml de Na_2SO_3 1,5 M. O THF foi removido sob pressão reduzida, e o pH da solução aquosa foi ajustado para pH 10 com NaHCO_3 , e lavada com acetato de etilo e éter. O pH foi então baixado para 1 com HCl 1 M e extraído com acetato de etilo. Os extractos foram combinados, secos sobre Na_2SO_4 e evaporados, originando o produto em bruto. A purificação por cromatografia flash em gel de sílica, utilizando ácido acético a 2%:clorofórmio, originou 50 mg do produto desejado.

RMN (CDCl_3): δ 9,43 (1H, s), 7,25 (5H, m), 5,64 (2H, m), 3,65 (3H, s), 3,05 (5H, m).

(5S)-monometil 5-(fenilmetil)-trans-hex-3-enamida

e) O ácido carboxílico do Exemplo 93(d) (50 mg, 0,2 mmol) foi dissolvido em 3 ml de tolueno e arrefecido até -50°C. Foi adicionada trietilamina (28 ml, 0,2 mmol), seguida por cloroformato de etilo (16 ml, 0,2 mmol). Após agitação durante uma hora a -50°C foi borbulhada amónia na solução, a qual foi então deixada aquecer até à temperatura ambiente e agitada durante 2 dias. A solução foi evaporada e o resíduo dissolvido em acetato de etilo, lavado com NaHCO_3 0,5 M e seco sobre MgSO_4 . A evaporação do solvente originou 50 mg do produto desejado.

RMN (CDCl_3): δ 7,25 (5H, m), 5,84 (2H, m), 3,68 (3H, s), 3,0 (5H, m).

5-amino-6-fenil-trans-hex-3-enoato de (5S)-metilo

f) A carboxamida do Exemplo 93(e) foi dissolvida em acetonitrilo-água (4:1), e I,I-bis(trifluoroacetoxi)iodosobenzene (1,5 equiv.) foi adicionado, e a reação foi agitada à temperatura ambiente até estar completa. A mistura reaccional foi acidificada até pH 2 com HCl 1 N e lavada com éter. O pH da solução aquosa foi então ajustado para 10 com NaOH 1 N, e o produto foi extraído com acetato de etilo. Os extractos foram secos sobre Na_2SO_4 e evaporados, originando o produto desejado.

5-t-butiloxicarbonilamino-6-fenil-trans-hex-3-enoato de (5S)-metilo

g) O composto do Exemplo 93(f) foi dissolvido em DMF em conjunto com trietilamina (3 equiv.). Foi adicionado dicarbonato de di-t-butilo (3 equiv.) e a reação foi deixada prosseguir à temperatura ambiente durante toda a noite. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto foi purificado por cromatografia flash em gel de sílica.

ácido (5S)-Boc-5-amino-6-fenil-trans-hex-3-enóico

h) O composto do Exemplo 93(g) foi dissolvido em dioxano:NaOH 1 N 1:1 (1 equiv. de NaOH) e agitado à temperatura ambiente até a reação estar completa. A solução foi acidificada com HCl 1 N e extraída com acetato de etilo para produzir o produto desejado.

Exemplo 94

Preparação de (5S)-alanil-alanil-(5-amino-6-fenil-trans-hex-3-enoil)-valil-valinamida

A resina peptídico protegida (5S) Boc-Ala-Ala-(5-amino-6-fenil-trans-hex-3-enoil)-Val-Val-BHA foi preparada de acordo com o processo usual do Exemplo 1. A resina peptídico é clivada e desprotegida por tratamento com 10 ml de HF líquido anidro/1 ml de anisol, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter dietílico, seca ao ar e extraída com

-149-

2 x 50 ml de ácido acético glacial, que foi liofilizado para produzir o péptido em bruto. O produto em bruto foi purificado por filtração em gel em Sephadex[®] G-15 utilizando ácido acético aquoso a 10% como eluente.

Exemplo 95

Preparação de Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

A resina peptídico protegida Boc-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada da maneira usual, numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, produzindo 145 mg do produto em bruto. O péptido em bruto (100 mg) foi dissolvido em HOAc a 1% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6x70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 84,4 mg do produto purificado.

HPLC: $k' = 2,95$ (Hamilton PRP-1[®], CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min).

MS (FAB): m/z 590 (M+H)⁺.

Exemplo 96

Preparação de Ala-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

A resina peptídico protegida Boc-Ala-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada da forma usual, numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 136,6 mg do produto em bruto. O péptido em bruto foi dissolvido em HOAc a 1% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 116,7 mg do produto purificado.

HPLC: $k' = 2,47$ (Hamilton PRP-1[®], CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min).

-150-

MS (FAB): m/z 661 (M+H)⁺.Exemplo 97Preparação de Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val

A resina peptídico protegida Boc-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr-(BrZ)-Pro-Val-Val-resina de Merrifield foi preparada da maneira usual, numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos de HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 248,8 mg do produto em bruto. O péptido em bruto foi dissolvido em HOAc a 1% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, para produzir 58,8 mg do produto purificado.

HPLC: $k' = 2,86$ (Hamilton PRP-1[®], CH₃CN a 10%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min).

MS (FAB): m/z 806 (M+H)⁺Exemplo 98Preparação de Ser-Gln-Asn-Cha-Pro-Val-Val-NH₂

A resina peptídico protegida Boc-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Cha-Pro-Val-Val-BHA foi preparada da maneira usual, numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos de HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 316 mg do produto em bruto. O péptido em bruto (100 mg) foi dissolvido em HOAc a 1% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, para produzir 88,1 mg do produto purificado.

HPLC: $k' = 3,31$ (Hamilton PRP-1[®], CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

MS (FAB): m/z 795 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: Asp 1,00, Ser 0,72, Glu 1,02, Pro 0,97, Val 2,01.

-151-

Exemplo 99Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Cha-Pro-Val-Val-NH₂

A resina peptídilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Cha-Pro-Val-Val-BHA foi preparada da forma usual, numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 280 mg do produto em bruto. O péptido em bruto (100 mg) foi dissolvido em HOAc a 1% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas produzindo 74,1 mg do produto purificado.

HPLC: $k' = 3,27$ (Hamilton PRP-1[®]), CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

MS (FAB): m/z 837 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: Asp 1,00, Ser 0,75, Glu 0,99, Pro 0,96, Val 1,90.

Exemplo 100Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-NH₂

A resina peptídilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(Bzl)-Pro-Val-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 1,0 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 145 mg do produto em bruto. O péptido em bruto (130 mg) foi dissolvido em HOAc a 1% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 101 mg do produto purificado.

MS (FAB): m/z 748,7 (M+H)⁺

HPLC: $k' = 2,08$ (Hamilton PRP-1[®]), CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min).

Análise dos aminoácidos: Asp 1,00, Ser 0,55, Glu 0,98, Pro 1,19, Val 0,95, Tyr 0,99.

-152-

Exemplo 101Preparação de Ac-Asp-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Arg-NH₂

A resina peptídico protegida Ac-Asp(OBzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Arg(Tos)-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 404 mg do produto em bruto. O péptido em bruto (100 mg) foi dissolvido em HOAc a 1% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 84,2 mg do produto parcialmente purificado. O péptido parcialmente purificado foi adicionalmente purificado por HPLC preparativa (Hamilton PRP-1[®], CH₃CN a 11%/TFA a 0,1%) para produzir 78,8 mg do produto purificado.

HPLC: $k' = 2,04$ (Hamilton PRP-1^R, CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

MS (FAB): m/z 932 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: Asp 1,88, Glu 0,90, Pro 0,76, Val 1,00, Tyr 0,33, Arg 1,01.

Exemplo 102Preparação de Asp-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

A resina peptídico protegida, Boc-Asp(OBzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 1,0 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 671 mg do produto em bruto. O péptido em bruto (100 mg) foi dissolvido em HOAc a 1% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 74,5 mg do produto purificado.

HPLC: $k' = 2,44$ (Hamilton PRP-1[®], CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)



-153-

MS (FAB): m/z 833 $(M+H)^+$

Análise dos aminoácidos: Asp 2,00, Glu 0,98, Pro 0,96, Val 2,04, Tyr 0,34.

Exemplo 103

Preparação de Ac-Ala-Ala-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

A resina peptídilo protegida Ac-Ala-Ala-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando o produto em bruto.

Exemplo 104

Preparação de Ac-Ala-Gln-Gly-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

A resina peptídilo protegida Ac-Ala-Gln-Gly-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 275 mg do produto em bruto. O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente utilizando o sistema n-BuOH-HOAc-H₂O 4:1:5, produzindo 235 mg do produto purificado.

HPLC: $k' = 4,48$ (Beckman Ultrasphere[®] ODS, CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

MS (FAB): m/z 831 $(M+H)^+$

Análise dos aminoácidos: Asp 1,02, Glu 1,00, Pro 0,97, Val 1,23, Tyr 0,87, Ala 1,04.

Exemplo 105

Preparação de D-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

A resina peptídilo protegida Boc-D-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr-(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada da forma usual numa escala de

-154-

0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 271 mg do produto em bruto. O péptido em bruto (98 mg) foi dissolvido em HOAc a 10% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 73 mg do produto purificado.

HPLC: $k' = 4,45$ (Beckman Ultrasphere[®] ODS, CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

MS (FAB): m/z 805 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: Asp 1,00, Glu 0,99, Pro 1,11, Val 1,89, Tyr 0,57, Ser 0,68.

Exemplo 106

Preparação de Ac-D-Ser-Gly-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

A resina peptídilo protegida Ac-D-Ser(Bzl)-Gly-Asn-Tyr-(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 248 mg do produto em bruto. O péptido em bruto (93 mg) foi dissolvido em HOAc a 10% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 75 mg do produto purificado.

HPLC: $k' = 4,16$ (Beckman Ultrasphere[®] ODS, CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

MS (FAB): m/z 847 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: Asp 1,00, Ser 0,67, Glu 0,99, Pro 0,93, Val 2,00, Tyr 0,30.

Exemplo 107

Preparação de Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ala-Val-NH₂

A resina peptídilo protegida Boc-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-

-155-

-Pro-Ala-Val-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 202 mg do produto em bruto. O péptido em bruto (102 mg) foi dissolvido em HOAc a 1% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 74 mg do produto purificado.

HPLC: $k' = 3,96$ (Beckman Ultrasphere[®] ODS, CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

MS (FAB): m/z 777 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: Asp 1,05, Ser 0,91, Glu 1,00, Ala 1,02, Pro 0,86, Val 1,09, Tyr 0,61.

Exemplo 108

Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Gly-Val-NH₂

A resina peptídico protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Gly-Val-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 153 mg do produto em bruto. O péptido em bruto (100 mg) foi dissolvido em HOAc a 10% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 76 mg do produto purificado.

HPLC: $k' = 3,87$ (Beckman Ultrasphere[®] ODS, CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

MS (FAB): m/z 805 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: Asp 1,00, Ser 0,84, Glu 0,95, Gly 1,00, Pro 0,97, Val 1,06, Tyr 0,77.

Exemplo 109

Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-Arg-NH₂

-156-

A resina peptídico protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-Arg(Tos)-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 329 mg do produto em bruto. O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente no sistema de n-BuOH-HOAc-H₂O 4:1:5. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 172 mg do produto purificado.

MS (FAB): m/z 1003 (M+H)⁺

HPLC: k' = 3,71 (Beckman Ultrasphere® C₁₈, CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min).

Análise dos aminoácidos: Asp 1,00, Ser 0,73, Glu 0,98, Pro 0,98, Val 1,84, Tyr 1,01, Arg 0,99.

Exemplo 110

Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Glu-Val-NH₂

A resina peptídico protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Glu(OBzl)-Val-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 184 mg do produto em bruto. O péptido em bruto (92 mg) foi dissolvido em HOAc a 10% e purificado numa coluna de Sephadex® G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 64 mg do produto purificado.

HPLC: k' = 3,83 (Beckman Ultrasphere® ODS, CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

MS (FAB): m/z 877 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: Asp 1,00, Ser 0,77, Glu 2,03, Pro 0,87, Val 1,08, Tyr 1,01.

-157-

Exemplo 111Preparação de Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Glu-Val-NH₂

A resina peptídico protegida Boc-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Glu(OBzl)-Val-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 216 mg do produto em bruto. O péptido em bruto (91 mg) foi dissolvido em HOAc a 10% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 67 mg do produto purificado.

HPLC: $k' = 3,35$ (Beckman Ultrasphere[®] ODS, CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

MS (FAB): m/z 835 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: Asp 0,97, Ser 0,90, Glu 2,03, Pro 1,00, Val 0,84.

Exemplo 112Preparação de Ac-Ser-Gln-Gly-Tyr-Pro-Lys-Val-NH₂

A resina peptídico protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Gly-Tyr(BrZ)-Pro-Lys(Cl₂Z)-Val-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 280 mg do produto em bruto. O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente utilizando o sistema n-BuOH-HOAc-H₂O 4:1:5, produzindo 242 mg do produto purificado.

HPLC: $k' = 4,41$ (Beckman Ultrasphere[®] ODS, CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

MS (FAB): m/z 876 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: Asp 1,00, Ser 0,68, Glu 1,01, Pro 0,82, Val 1,14, Tyr 1,06, Lys 1,00.



-158-

Exemplo 113Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-NH₂

A resina peptídilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 1,0 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 400 mg do produto em bruto. O péptido em bruto (100 mg) foi dissolvido em HOAc a 1% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 92,8 mg do produto purificado.

MS (FAB): m/z 649 (M+H)⁺HPLC: k' = 1,57 (Hamilton PRP-1[®], CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

Análise dos aminoácidos: Asp 1,00, Ser 0,92, Glu 1,03, Pro 0,87, Tyr 0,95.

Exemplo 114Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-Gln-Asn-NH₂

A resina peptídilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-Gln-Asn-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 1,0 mmol. O péptido foi clivado da resina, com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 862 mg do produto em bruto. O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente no sistema de n-BuOH-HOAc-H₂O 4:1:5. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, originando 713 mg do produto purificado.

MS (FAB): m/z 1089 (M+H)⁺HPLC: k' = 2,17 (Hamilton PRP-1[®], CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

Análise dos aminoácidos: Asp 1,81, Ser 0,97, Glu 2,00, Pro 0,88, Val 1,81, Tyr 1,23.

Exemplo 115

Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Phe-Pro-Val-Val-NH₂

A resina peptídilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Phe-Pro-Val-Val-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 1,0 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 573 mg do produto em bruto. O péptido em bruto (30 mg) foi purificado por HPLC preparativa (Hamilton PRP-1[®], CH₃CN a 17%/TFA a 0,1%), originando 24,5 mg do produto purificado.

MS (FAB): m/z 831 (M+H)⁺

HPLC: k' = 3,02 (Hamilton PRP-1[®], CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min).

Análise dos aminoácidos: Asp 1,06, Ser 0,86, Glu 1,00, Pro 1,02, Val 1,95, Phe 1,00.

Exemplo 116

Preparação de Boc-L-valina isopropilamida

Boc-L-valina (0,5 g, 2,3 mmol) foi dissolvida em 25 ml de DMF em conjunto com isopropilamina (0,39 ml, 4,6 mmol), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)-fosfónio (2,03 g, 4,6 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (0,62 g, 4,6 mmol) e diisopropiletilamina (1,2 ml, 6,9 mmol). A reacção foi agitada à temperatura ambiente durante 2 horas, e, em seguida, foi evaporada até à secura. O resíduo foi dissolvido em acetato de etilo e lavado com NaHSO₄ 1 N, NaHCO₃ 1 N e água e, em seguida, seco sobre Na₂SO₄. O solvente foi removido sob pressão reduzida, originando 0,53 g do produto em bruto. O produto foi purificado por cromatografia flash em gel de sílica, utilizando MeOH a 25%/CHCl₃, produzindo 358 mg do produto purificado.

MS (DCI), m/z 259 (M+H)⁺

RMN (CDCl₃): δ 0,90 ppm, d, 0,98 ppm, d, 6H; 1,16 ppm, d, 6H; 1,35 ppm, s, 9H; 4,1 ppm, dd, 1H; 5,25 ppm, d, 1H; 6,14 ppm, d, 1H.

-160-

Exemplo 117Preparação de Ac-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

A resina peptídilo protegida Ac-Tyr(BrZ)-Pro-Val-Val-BHA foi preparada da forma usual, numa escala de 0,5 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 98,7 mg do produto em bruto. O péptido em bruto foi dissolvido em HOAc a 1% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 78,5 mg do produto purificado.

HPLC: $k' = 2,96$ (Hamilton PRP-1[®]), CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min).

MS (FAB): m/z 518 (M+H)⁺

Exemplo 118Preparação de Ac-Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-NH₂

A resina peptídilo protegida Ac-Arg(Tos)-Ala-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 1,0 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 621 mg do produto em bruto. O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente no sistema de n-BuOH-EtOAc-HOAc-H₂O 2:2:1:5. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 549 mg do produto parcialmente purificado. Este péptido parcialmente purificado (100 mg) foi dissolvido em HOAc a 10% e purificado numa coluna de Sephadex[®] G-15 de 2,6 x 70 cm. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 94 mg do produto purificado.

MS (FAB): m/z 876 (M+H)⁺

HPLC: $k' = 2,78$ (Beckman Ultrasphere[®] C₁₈, CH₃CN a 5%/TFA a 0,1%



-161-

a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min).

Análise dos aminoácidos: Asp 1,00, Ser 1,03, Glu 1,01, Pro 0,91, Ala 1,02, Arg 0,99, Tyr 0,94.

Exemplo 119

Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro

A resina peptídilo protegida Ac-Ser(Bzl)-Gln-Asn-Tyr(BrZ)-Pro-resina de Merrifield foi preparada da forma usual, numa escala de 1,0 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, produzindo 458,5 mg do produto em bruto, o qual foi utilizado sem caracterização posterior.

Exemplo 120

Preparação de Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-HNiPr

Boc-Val isopropilamida 1034 (24,4 mg, 154 mmol) foi desprotegida por tratamento com TFA a 50%/CH₂Cl₂, durante 20 min à temperatura ambiente. A mistura reaccional foi evaporada até à secura e o resíduo foi evaporado, seis vezes, a partir de CH₂Cl₂, tratado com diisopropilamina a 7%/CH₂Cl₂ e evaporado três vezes e, em seguida, evaporado quatro vezes a partir de CH₂Cl₂. O resíduo foi dissolvido em 25 ml de DMF, em conjunto com o péptido 1035 (50 mg, 77 mmol), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitros-(dimetilamino)fosfónio (68 mg, 154 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (20,8 mg, 154 mmol) e diisopropiletilamina (40,2 ml, 231 mmol) e a reacção foi deixada prosseguir durante toda a noite à temperatura ambiente. A mistura reaccional foi evaporada até à secura e o resíduo foi dissolvido em MeOH e purificado por HPLC preparativa (Beckman Ultrasphere® ODS, CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min), originando 41 mg do péptido purificado.

HPLC: $k' = 4,97$ (Beckman Ultrasphere® ODS, CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

MS (FAB): m/z 790,5 (M+H)⁺

-162-

Análise dos aminoácidos: Asp 1,00, Ser 0,72, Glu 1,02, Pro 1,13, Val 0,65, Tyr 0,83.

Exemplo 121

Preparação de Ac-Arg-Lys-Ile-Leu-Phe-Leu-Asp-Gly-NH₂

A resina peptídico protegida Boc-Arg(Tos)-Lys(Cl₂Bzl)-Ile-Leu-Phe-Leu-Asp(OBzl)-Gly-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 1,0 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 520 mg do produto em bruto. O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente no sistema de n-BuOH-HOAc-H₂O 4:1:5. As fracções apropriadas foram reunidas e liofilizadas, produzindo 440 mg do produto parcialmente purificado. O péptido parcialmente purificado (50 mg) foi adicionalmente purificado por HPLC preparativa (Hamilton PRP-1[®], CH₃CN a 23%/TFA a 0,1%) para produzir 37,5 mg do péptido purificado.

HPLC: $k' = 3,81$ (Hamilton PRP-1[®], CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

MS (FAB): m/z 1002 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: Asp 1,00, Gly 1,05, Ile 0,91, Leu 2,08, Lys 0,94, Arg 1,07, Phe 1,29.

Exemplo 122

Preparação de Ac-Arg-Lys-Ile-Leu-(4'NO₂)Phe-Leu-Asp-Gly-NH₂

A resina peptídico protegida Ac-Arg(Tos)-Lys(Cl₂Z)-Ile-Leu-(4'NO₂)Phe-Leu-Asp(OBzl)-Gly-BHA foi preparada da forma usual numa escala de 1,0 mmol. O péptido foi clivado da resina com HF líquido anidro, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF, a resina foi lavada com éter, seca ao ar e extraída com 3 x 30 ml de HOAc a 10%. Os extractos do HOAc foram diluídos com água e liofilizados, originando 980 mg do produto em bruto. O péptido em bruto foi purificado por distribuição em contracorrente utilizando o sistema de n-BuOH-HOAc-H₂O 4:1:5, produzindo 853 mg do produto

-163-

parcialmente purificado. O péptido parcialmente purificado (50 mg) foi adicionalmente purificado por HPLC preparativa (Hamilton PRP-1[®], CH₃CN a 23%/TFA a 0,1%) originando 43,4 mg do péptido purificado.

HPLC: $k' = 3,87$ (Hamilton PRP-1[®], CH₃CN a 5%/TFA a 0,1% a CH₃CN a 40%/TFA a 0,1%, 15 min)

MS (FAB): m/z 1047,7 (M+H)⁺

Análise dos aminoácidos: Asp 1,00, Gly 1,04, Ile 0,89, Leu 2,00, Arg 0,91, (4'-NO₂)Phe 0,97, Lys 0,91.

Exemplo 123

Preparação de ácido (4S,5S)-5-(terc-butildimetilsiloxi)-5-(terc-butiloxicarbonil)-amino-6-fenil-hexanóico

(S)-terc-butiloxicarbonilfenilalanina N-metoxi-N-metil amida

a) O composto do título foi preparado seguindo o processo de Org. Syn., 67, 69 (1988), excepto pela utilização de Boc-(L)-Phe em lugar de Boc-(L)-Leu.

$[\alpha]_{365} = + 34^{\circ}$ (c 1, etanol).

(6S)-5-oxo-6-(terc-butiloxicarbonil)amino-7-fenil-hept-1-eno

b) Um frasco de 3 gargalos de 2 litros, seco à chama adaptado com um agitador mecânico, termómetro, condensador, borbulhador de ar, e um funil de adição contendo 4-bromo-1-buteno puro (90,2 ml, 0,889 mol), foi carregado com pó de Mg (32 g, 1,3 mol), e éter seco (600 ml). Uma fracção de 2 ml do bromobuteno foi adicionada e a mistura sob agitação foi aquecida até 30°C com um banho de água até que a reacção se iniciasse (cerca de 5 min). O restante do bromobutano foi então adicionado durante 1,5 hora, a uma velocidade tal que foi mantido um refluxo suave. A mistura foi aquecida até ao refluxo durante mais 30 min, sendo, em seguida, arrefecida até 5°C. Uma solução do composto do Exemplo 123 (a) (54,0 g, 0,175 mol) em éter (130 ml) foi adicionada em fracções durante 15 min, com a temperatura da reacção mantida abaixo de 12°C. Após 1 hora de agitação vigorosa a 5°C, a mistura foi vertida cautelosamente em 500 ml de HCl 3 N frio (5-10°C). As camadas foram separadas e a camada aquosa foi extraída com duas por

ções de 200 ml de éter. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com NaHCO_3 a 5% e salmoura, em seguida foram secas sobre MgSO_4 , filtradas e concentradas por evaporação rotatória, originando o produto em bruto (49,4 g, 0,163 mol, rendimento de 93%) como um sólido branco, suficientemente puro para utilização na próxima reacção. Uma porção do produto foi purificada por cromatografia flash (sílica, acetato de etilo a 10% em hexano) para análise.

p.f.: 74-75°C

$[\alpha]_D = -36,8^\circ$ (c 1, etanol).

ácido (5S)-4-oxo-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-6-fenil-hexanóico

c) O composto do Exemplo 123(b) (45,0 g, 0,148 mol) foi rapidamente agitado com benzeno (550 ml), água (550 ml) e ácido acético (115 ml), a 3°C. Foi adicionado brometo de tetrabutílamônio (490 mg), seguido por KMnO_4 (83 g). A mistura sob agitação foi deixada aquecer até à temperatura ambiente. Após 2,5 horas, mais KMnO_4 (14 g) foi adicionado. Após 30 min adicionais, a mistura reaccional foi arrefecida até 5°C e 500 ml de KHSO_4 aquoso saturado foram adicionados. A mistura foi agitada durante 30 min e, em seguida, filtrada. As camadas foram separadas, a camada aquosa foi extraída com quatro porções de 200 ml de acetato de etilo. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secas sobre MgSO_4 , filtradas e concentradas até um óleo. O óleo foi cristalizado a partir de 350 ml de hexano:acetato de etilo 6:1, originando o composto do título (33,3 g, rendimento de 70%) como um sólido branco.

$[\alpha]_D = -36,1^\circ$.

ácido (5S)-4-oxo-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-6-fenil-hexanóico, éster de benzilo

d) A uma solução agitada do composto do Exemplo 123(c) (33,2 g) em acetonitrilo (500 ml), a 4°C, foi adicionado diazabicycloundecano (15,7 g), seguido por brometo de benzilo (26,0 g). A mistura foi agitada com aquecimento até à temperatura ambiente durante 3 horas, em seguida foi concentrada até 70 ml por evaporação rotatória. A mistura foi diluída com CH_2Cl_2 , lavada com HCl

-165-

1 N, NaHCO_3 a 5%, e salmoura, seca sobre MgSO_4 e concentrada até um sólido amarelo. O sólido foi triturado com éter:hexano 3:1, originando o composto do título (33,0g, rendimento de 78%).

p.f.: 86-87,5°C

$[\alpha]_D = -27,8^\circ$

éster de benzilo do ácido (4S,5S)-4-(terc-butildimetilsiloxi)-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-6-fenil-hexanóico

e) Uma solução do composto do Exemplo 123(d) (28,0 g) em metanol (840 ml) foi arrefecida até 5°C, e NaBH_4 (1,30 g) foi adicionado, numa porção, com agitação. Após 30 min, foi adicionado ácido acético (10 ml) e a mistura foi concentrada por evaporação rotatória, em seguida, foi diluída com CH_2Cl_2 e lavada com água. A camada orgânica foi seca (Na_2SO_4) e concentrada, fornecendo os álcoois diastereoméricos em bruto como um sólido branco (27,7 g, rendimento de 99%). Os álcoois em bruto foram dissolvidos em DMF (140 ml) em conjunto com imidazol (17,7 g) e cloreto de terc-butildimetilsililo (20,7 g). A mistura foi deixada repousar à temperatura ambiente durante 3 dias, em seguida foi diluída com 300 ml de HCl 1 N frio e extraída com seis porções de 100 ml de CH_2Cl_2 . Os extractos orgânicos combinados foram lavados com 3 x 100 ml de água, secos (Na_2SO_4) e concentrados sob vácuo, um aquecimento até 40°C, para fornecer um óleo (42 g). Os dois isómeros foram separados por HPLC preparativa em quatro porções iguais em 2,5 kg de sílica Vydac HS (2,54 cm x 1 m), utilizando hexano:acetato de etilo 90:10 a 200 ml/min, originando 9,0 g do composto do título como um óleo.

HPLC: RT 9,18 min (isómero 4S), 12,2 min (isómero 4R) (YMC sílica A-003, 4,6 mm x 25 cm, detecção com UV a 254 nm, hexano:acetato de etilo 91:9, 1,0 ml/min), (4R):(4S) = 3:1.

$[\alpha]_D = -14,4^\circ$

ácido (4S,5S)-4-(terc-butildimetilsiloxi)-5-(terc-butiloxicarbonil)-amino-6-fenil-hexanóico

f) O composto do Exemplo 123(e) (7,7 g) foi dissolvido em acetato de etilo (150 ml) com Pd a 5% em carbono (0,75 g) e foi agitado sob $1,72 \times 10^5$ Pa de H_2 durante 4 horas. A mistura

-166-

foi filtrada através de Celite® e concentrada sob vácuo, com aquecimento, para fornecer o composto do título como um vidro incolor (6,3 g, rendimento de 98%).

$[\alpha]_D = -24,7^\circ$.

Exemplo 124

Preparação de (5S)-benziloxycarbonilalanil-alanil-(5-amino-6-fenil-trans-hex-3-enoil)-valil-valinamida

O composto do Exemplo 94 foi dissolvido em DMF ao qual foram adicionados 2 equiv. de trietilamina e 1,5 equiv. de N-(benziloxycarboniloxi)succinimida. A extensão da reacção foi monitorizada por HPLC e o produto foi purificado directamente a partir da mistura reaccional por HPLC preparativa, utilizando um sistema de acetonitrilo-água-ácido trifluoroacético a 0,1%, numa coluna de Hamilton PRP-1® de polistireno.

Exemplo 125

Preparação de (5S)-benziloxycarbonilalanil-alanil-(5-amino-6-fenil-cis-3,4-di-hidroxi-hexanoil)-valil-valinamida

O composto do Exemplo 124 foi dissolvido em THF em conjunto com N-óxido de N-metilmorfolina (3 equiv.). Tetróxido de ósmio (0,04 equiv. de uma solução a 2,5% em n-butanol) é adicionado e a reacção foi deixada prosseguir à temperatura ambiente. Quando a reacção se completou, a mistura reaccional foi repartida entre acetato de etilo e salmoura, a salmoura foi lavada "back-washed" com acetato de etilo, e as camadas do acetato de etilo combinadas foram lavadas com Na_2SO_3 a 10%, NaHSO_4 1 N, secas sobre Na_2SO_4 e evaporadas para originar o produto em bruto como uma mistura de álcoois cis diastereoméricos. Os produtos foram purificados por HPLC preparativa, utilizando um sistema de acetonitrilo-água-ácido trifluoroacético a 0,1%, numa coluna Hamilton PRP-1® de polistireno.

-167-

Exemplo 126

Preparação de (4S,5S)-alanilalanil-(6-fenil-5-amino-4-hidroxi-hexanoil)-valil-valina

A resina peptídico protegida (4S,5S) Boc-Ala-Ala-(6-fenil-5-amino-4-t-butildimetil-sililoxi-hexanoil)-Val-Val-resina de Merrifield foi preparada de acordo com o processo usual. A resina peptídico foi clivada e desprotegida por tratamento com 10 ml de HF líquido anidro/1 ml de anisol, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter dietílico, seca ao ar e extraída com 2 x 50 ml de ácido acético glacial, o qual foi liofilizado para produzir o péptido em bruto. O produto em bruto foi purificado por filtração em gel em Sephadex® G-15, utilizando ácido acético aquoso a 10% como eluente.

Exemplo 127

Preparação de (4S,5S)-benziloxycarbonilalanil-alanil-(6-fenil-5-amino-4-hidroxi-hexanoil)-valil-valina

O composto do Exemplo 126 foi dissolvido em DMF, ao qual foram adicionados 2 equiv. de trietilamina e 1,5 equiv. de N-(benziloxycarboniloxi)succinimida. A extensão da reacção foi monitorizada por HPLC e o produto foi purificado directamente a partir da mistura reaccional por HPLC preparativa, utilizando um sistema de acetonitrilo-água-ácido trifluoroacético a 0,1%, numa coluna Hamilton PRP-1® de polistireno.

Exemplo 128

Preparação de (4S,5S)-benziloxycarbonilalanil-alanil-(6-fenil-5-amino-4-hidroxi-hexanoil)-valil-valil-(5-aminopentil)amida mono-Boc-1,5-diaminopentano

a) Uma solução de 1,5-diaminopentano (14,0 ml, 120 mmol) em 70 ml de CH_2Cl_2 foi tratada com dicarbonato de di-t-butilo (7,24 g, 33,2 mmol), a 0°C, e foi, em seguida, agitada durante toda a noite à temperatura ambiente. A mistura reaccional foi diluída com 75 ml de CHCl_3 , lavada com carbonato de sódio aquoso a 5%, seca sobre MgSO_4 e evaporada. O resíduo foi dissolvido num

-168-

volume mínimo de HCl 1 N (10 ml) e lavado com éter dietílico. A camada aquosa foi então alcalinizada até pH 10 com NaOH 2 N e extraída com acetato de etilo. Os extractos foram combinados, secos sobre $MgSO_4$ e evaporados para originar 1,6 g do produto desejado.

RMN ($CDCl_3$): δ 1,43 (17 H, br. s), 2,53-2,83 (2 H, m), 2,90-3,10 (2H, m), 4,80-5,10 (1H br. s).

MS (CI): m/z 237 ($M+Cl$)⁻.

(4S,5S)-benziloxycarbonilalanil-alanil-(6-fenil-5-amino-4-hidroxi-hexanoil)-valil-valil-(5-aminopentil)amida

b) O composto do Exemplo 126 foi dissolvido em DMF com mono-Boc-1,5-diamino-pentano (3 equiv.), 1-hidroxibenzotriazol (1,5 equiv.) e diisopropilcarbodiimida (1,5 equiv.), e a reacção foi agitada à temperatura ambiente e monitorizada por HPLC. Quando a reacção se completou, a mistura reaccional foi evaporada até à secura e o resíduo foi tratado com ácido trifluoroacético, a 0°C durante 30 minutos. O ácido trifluoroacético foi removido sob pressão reduzida, e o resíduo foi dissolvido em metanol e purificado por HPLC de fase invertida, utilizando um sistema de acetoneitrilo-água-ácido trifluoroacético a 0,1%, numa coluna Hamilton PRP-1[®] de polistireno.

Exemplo 129

Preparação de (4S,5S)-benziloxycarbonilalanil-alanil-(6-fenil-5-amino-4-hidroxi-hexanoil)-valil-valil-(5-guanidinopentil)amida

O composto do Exemplo 128 foi dissolvido em água, e o pH foi ajustado para 10 com NaOH 3 N. Após arrefecimento até 0°C, foi adicionada uma solução aquosa de sulfato de O-metilisoureia ajustada para pH 10 com NaOH 3 N. A reacção foi monitorizada por HPLC e o pH foi continuamente ajustado para 10 com a adição de NaOH 3 N. Após conclusão da reacção, o pH foi diminuído para 4,5 pela adição de ácido acético a 1%, e o produto foi purificado por HPLC de fase invertida, utilizando um sistema de acetoneitrilo-água-ácido trifluoroacético a 0,1%, numa coluna Hamilton PRP-1[®] de polistireno.

-169-

Exemplo 130Preparação de (4S,5S)-alanil-alanil-(6-fenil-5-amino-4-hidroxi-hexanoil)-valil-valinamida

A resina peptídilo protegida (4S,5S) Boc-Ala-Ala-(6-fenil-5-amino-4-t-butildimetil-sililoxi-hexanoil)-Val-Val-BHA foi preparada de acordo com o processo usual do Exemplo 1. A resina peptídilo foi clivada e desprotegida por tratamento com 10 ml de HF líquido anidro/1 ml de anisol, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter dietílico, se ca ao ar e extraída com 2 x 50 ml de ácido acético glacial, o qual foi liofilizado para produzir o péptido em bruto. O produto em bruto foi purificado por filtração em gel em Sephadex® G-15 utilizando ácido acético aquoso a 10% como eluente.

Exemplo 131Preparação de (4S,5S)-alanil-(6-fenil-5-amino-4-hidroxi-hexanoil)-valil-valinamida

A resina peptídilo protegida (4S,5S) Boc-Ala-(6-fenil-5-amino-4-t-butildimetil-sililoxi-hexanoil)-Val-Val-BHA foi preparada de acordo com o processo usual. A resina peptídilo foi clivada e desprotegida por tratamento com 10 ml de HF líquido anidro/1 ml de anisol, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter dietílico, seca ao ar e extraída com 2 x 50 ml de ácido acético glacial, o qual foi liofilizado para produzir o péptido em bruto. O produto em bruto foi purificado por filtração em gel em Sephadex® G-15, utilizando ácido acético aquoso a 10% como eluente.

Exemplo 132Preparação de (4S,5S)-benziloxicarbonilalanil-alanil-(6-fenil-5(S)-amino-4(S)-hidroxi-hexanoil)-valil-valinamida

O composto do Exemplo 130 foi dissolvido em DMF, ao qual foi adicionado 1 equiv. de trietilamina e 1,5 equiv. de N-(benziloxicarboniloxi)succinimida. A extensão da reacção foi monitorizada por HPLC, e o produto foi purificado directamente a partir da

-170-

mistura reaccional por HPLC preparativa, utilizando um sistema de acetonitrilo-água-ácido trifluoroacético a 0,1%, numa coluna de Hamilton PRP-1[®] de polistireno.

Exemplo 133

Preparação de (4S,5S)-alanilalanil-(6-fenil-5-amino-4-hidroxi-hexanoil)-valina

A resina peptídilo protegida (4S,5S) Boc-Ala-Ala-(6-fenil-5-amino-4-t-butildimetil-sililoxi-hexanoil)-Val-resina de Merrifield foi preparada de acordo com o processo usual. A resina peptídilo foi clivada e desprotegida por tratamento com 10 ml de HF líquido anidro/1 ml de anisol, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter dietílico, se ca ao ar e extraída com 2 x 50 ml de ácido acético glacial, o qual foi liofilizado originando o péptido em bruto. O produto em bruto foi purificado por filtração em gel em Sephadex[®] G-15, utilizando ácido acético aquoso a 10% como eluente.

Exemplo 134

Preparação de (4S,5S)-benziloxycarbonilalanilalanil-(6-fenil-5-amino-4-hidroxi-hexanoil)-valina

O composto do Exemplo 133 foi dissolvido em DMF ao qual foram adicionados 2 equiv. de trietilamina e 1,5 equiv. de N-(benziloxycarboniloxi)succinimida. A extensão da reacção foi monitorizada por HPLC, e o produto foi purificado directamente a partir da mistura reaccional por HPLC preparativa utilizando um sistema de acetonitrilo-água-ácido trifluoroacético a 0,1%, numa coluna Hamilton PRP-1[®] de polistireno.

Exemplo 135

Preparação de (4S,5S)-benziloxycarbonilalanilalanil-(6-fenil-5-amino-4-hidroxi-hexanoil)-valil-(1-aminometil-2-metil)propilamida

carbobenziloxi-L-valinol

a) L-valinol foi dissolvido em água contendo 1 equiv. de NaOH, e foi arrefecido até 5°C num banho de gelo. Foram adiciona

-171-

dos cloroformato de benzilo (1,1 equiv.) e NaOH 4 N (1,2 equiv.) alternadamente, em diversas porções. Quando a reacção se completou, a mistura reaccional foi extraída com acetato de etilo e os extractos foram combinados, secos sobre Na_2SO_4 e concentrados. O produto em bruto foi purificado por cromatografia flash em gel de sílica.

1-ftaloilamino-2-carbobenziloxiamino-3-metilbutano

b) Carbobenziloxi-L-valinol foi dissolvido em THF, em conjunto com trifenilfosfina (1,1 equiv.) e ftalimida (1,1 equiv.) e arrefecido até -5°C num banho salino gelado. Foi adicionado diisopropilazidodicarboxilato (1,1 equiv.) e a reacção foi agitada durante 1 hora a -5°C e deixada aquecer até à temperatura ambiente. Após agitação durante toda a noite à temperatura ambiente, a mistura reaccional foi evaporada e o resíduo foi purificado por cromatografia flash, produzindo o composto desejado.

1-t-butiloxicarbonilamino-2-carbobenziloxiamino-3-metilbutano

c) 1-Ftalonilamino-2-carbobenziloxiamino-3-metilbutano foi dissolvido em etanol e tratado, à temperatura ambiente, com hidrato de hidrazina (2 equiv.). Quando a reacção se completou por TLC, a mistura reaccional foi evaporada e o resíduo dissolvido em DMF. Foram adicionados dicarbonato de di-t-butilo (3 equiv.) e trietilamina (3 equiv.) e a reacção foi agitada à temperatura ambiente durante toda a noite. A mistura reaccional foi evaporada e o resíduo foi purificado por cromatografia flash em gel de sílica, produzindo o composto desejado.

(4S,5S)-benziloxicarbonilalanil-alanil-(6-fenil-5-amino-4-hidroxihexanoil)-valil-(1-aminometil-2-metil)propilamida

d) 1-t-Butiloxicarbonilamino-2-carbobenziloxiamino-3-metilbutano foi dissolvido em metanol e hidrogenado sobre paládio a 10% em carbono a $2,76 \times 10^5$ Pa durante 1 hora. A mistura reaccional foi filtrada através de uma almofada de Celite[®], evaporada até à secura para originar 1-t-butiloxicarbonil-2-amino-3-metilbutano.

-172-

(4S,5S)-benziloxycarbonilalanil-alanil-(6-fenil-5-amino-4-hidroxi-hexanoil)-valil-(1-aminometil-2-metil)propilamida

e) O composto do Exemplo 134 foi dissolvido em DMF em conjunto com 1-t-butiloxycarbonil-2-amino-3-metilbutano (3 equiv.) 1-hidroxibenzotriazol (1,5 equiv.) e diisopropilcarbodiimida (1,5 equiv.) e a reacção foi agitada à temperatura ambiente e monitorizada por HPLC. Quando a reacção se completou, a mistura reaccional foi evaporada até à secura e o resíduo foi tratado com ácido trifluoroacético, a 0°C durante 30 minutos. O ácido trifluoroacético foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em metanol e purificado por HPLC de fase invertida, utilizando um sistema de acetonitrilo-água-ácido trifluoroacético a 0,1%, numa coluna Hamilton PRP-1[®] de polistireno.

Exemplo 136

Preparação de ácido (2R,5S)-2-(fenilmetil)-5-t-butiloxycarbonil-amino-6-fenil-hex-3-enóico

2(S)-t-butiloxycarbonilamino-3-fenilpropanol

a) Boc-L-Fenilalanina foi dissolvida em THF contendo trietilamina (1 equiv.) arrefecida até -5°C. Foi adicionado cloroformato de etilo (21 equiv.) em THF, gota a gota, durante 15 min, e a reacção foi agitada durante 30 min a -5°C. A mistura reaccional foi filtrada e adicionada, gota a gota durante 30 min, a uma solução de boro-hidreto de sódio (2,5 equiv.) em água, a 0°C. A reacção foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e foi agitada durante 2 horas. A mistura reaccional foi acidificada com HCl 1 N, a camada aquosa foi separada e lavada com éter. As camadas do éter e do THF foram combinadas, lavadas com NaOH a 10%, água, secas sobre Na₂SO₄ e concentradas, originando o composto do título.

(2S)-1-(metilsulfonyl)oxi-2-t-butiloxycarbonilamino-3-fenilpropano

b) O composto do Exemplo 136(a) foi dissolvido em CH₂Cl₂ contendo trietilamina (1,5 equiv.), e foi arrefecido até -10°C. A isto foi adicionado cloreto de metano-sulfonylo (1,1 equiv.), durante 10 min. Após agitação durante 10 min e 10°C, a mistura reac

-173-

cional foi extraída com água gelada, HCl a 10% frio, NaHCO_3 saturado, e salmoura. A camada orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 e concentrada, originando o composto do título.

(2S)-1-feniltio-2-t-butiloxycarbonilamino-3-fenilpropano

c) Tiofenol (4 equiv.) foi dissolvido numa mistura de THF e metanol. Foi adicionado metóxido de sódio (4 equiv.) e a reacção foi agitada à temperatura ambiente durante 15 min. O composto do Exemplo 136(b) (1 equiv.) foi adicionado e a temperatura aumentada até 50°C durante 2,5 h. A mistura reaccional foi diluída com NaOH a 10%, extraída com CH_2Cl_2 e evaporada originando o composto do título.

(2S)-1-(benzenosulfonil)-2-t-butiloxycarbonilamino-3-fenilpropano

d) O composto do Exemplo 136(c) foi dissolvido em CH_2Cl_2 , arrefecido até 0°C e ácido m-cloroperbenzóico (3,5 equiv.) foi adicionado. A reacção foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e agitada durante 1 hora. A mistura reaccional foi dividida entre CH_2Cl_2 e saturada com NaHSO_4 , e a camada orgânica foi lavada com NaHCO_3 1 N, seca sobre Na_2SO_4 e evaporada, originando o composto do título.

(4R)-(2-oxo-4-(fenilmetil)-3-oxazolidinil)-5-metilpent-3-enoato

e) O composto do título foi preparado de acordo com o processo do Exemplo 93(b), substituindo por ácido 4-metilpent-3-enóico o ácido monometil trans-hex-3-enóico, e por (R)-benziloxazolidinona a (S)-benziloxazolidinona.

(2R,4R)-(2-oxo-4-(fenilmetil)-3-oxazolidinil)-2-(fenilmetil)-5-metilpent-3-enoato

f) Utilizando o composto do Exemplo 136(e), o composto do título foi preparado de acordo com o processo do Exemplo 93(c).

(2R) 2-(fenilmetil)-5-metilpent-3-en-1-ol

g) O composto do Exemplo 136(f) em THF foi arrefecido até -78°C e tratado com LiAlH_4 (1 equiv.). Após agitação durante 30 min a -78°C, a reacção foi deixada aquecer até 0°C durante 1 hora. Após 30 min a 0°C, a mistura reaccional foi então novamen-

-174-

te arrefecida até -78°C , e foi adicionado 1 ml de acetato de etilo. A reacção foi rapidamente arrefecida com cloreto de amónio aquoso saturado a -78°C , deixada aquecer até à temperatura ambiente e diluída com água. A mistura reaccional foi extraída com éter e os extractos foram secos sobre Na_2SO_4 e evaporados, produzindo o composto do título, o qual foi purificado por cromatografia flash em gel de sílica.

(2R)-1-(tetra-hidropiranyl)oxi-2-(fenilmetil)-5-metil-3-penteno

h) O composto do Exemplo 136 (g) foi dissolvido em CH_2Cl_2 e foi adicionado di-hidropirano (1,5 equiv.) em conjunto com p-tolueno-sulfonato de piridínio (0,1 equiv.) e foi agitado à temperatura ambiente durante 4 horas. A solução foi diluída com éter, lavada com água salgada, seca sobre Na_2SO_4 e evaporada, produzindo o composto do título.

(2S)-2-(fenilmetil)-3-tetra-hidropiraniloxipropionaldeído

i) O composto do Exemplo 136(h) foi dissolvido em CH_2Cl_2 , arrefecido até -78°C e tratado com ozono até que uma cor azul persistisse. A reacção foi rapidamente arrefecida com sulfeto de dimetilo, deixada aquecer até à temperatura ambiente e concentrada por evaporação, produzindo o composto do título, o qual foi utilizado sem purificação posterior.

(2R,5S)-1-(tetra-hidropiranyl)oxo-2-(fenilmetil)-5-t-butiloxicarbonilamino-6-fenil-hex-3-eno

j) Uma solução da sulfona do Exemplo 136(d) em THF foi arrefecida até -78°C , foi tratada com metil-lítio (2 equiv. de uma solução 1,6 M em éter) durante 5 min, e agitada a -78°C durante 20 min. Num frasco separado, o aldeído do Exemplo 136(i) (2,75 equiv.) em THF foi arrefecido até -78°C e tratado com metóxido de diisobutilalumínio (2,25 equiv.) em THF (preparado pela adição de uma quantidade equimolar de metanol a hidreto de diisobutilalumínio 1 M em THF). A solução do aldeído foi transferida para a sulfona dianiónica por meio de uma cânula, e agitada a -78°C durante 30 min. A reacção foi rapidamente arrefecida pela adição de cloreto de amónio aquoso saturado e o produto foi extraído com éter, seco sobre MgSO_4 e concentrado sob pressão redu-

zida.

A β -hidroxi-sulfona em bruto foi dissolvida em metanol e arrefecida até 0°C. Foi adicionado fosfato de hidrogénio dissódico (4 equiv.), seguido por amalgama de sódio a 5% (12 equiv.). Após agitação durante 4 horas a 0°C, a reacção foi diluída com água e extraída com CH_2Cl_2 , seca sobre MgSO_4 e concentrada. O produto em bruto foi purificado por cromatografia flash em gel de sílica, originando o composto do título.

ácido (2R,5S)-2-(fenilmetil)-5-t-butiloxycarbonilamino-6-fenil-hex-3-enóico

k) O composto do Exemplo 136(j) foi dissolvido em acetona, arrefecido até 0°C e tratado, gota a gota, com reagente de Jones (3 equiv.). Após agitação durante 3 horas, a mistura reaccional foi diluída com água e extraída com éter. Os extractos etéreos foram lavados com NaOH a 5% e as lavagens aquosas foram combinadas, acidificadas até pH 2 com HCl a 10% e extraídas com éter. Os extractos do éter foram secos sobre Na_2SO_4 e evaporados, originando o composto do título.

Exemplo 137

Preparação de (2R,5S)-alanilalanil-(2-(fenilmetil)-5-amino-6-fenil-trans-hex-3-enoil)-valil-valinamida

A resina-péptido protegida (2R,5S) Boc-Ala-Ala-(2-(fenilmetil)-5-amino-6-fenil-trans-hex-3-enoil)-Val-Val-BHA foi preparada de acordo com o processo usual do Exemplo 1. A resina peptídica foi clivada e desprotegida por tratamento com 10 ml de HF líquido anidro/1 ml de anisol, a 0°C durante 1 hora. Após remoção do HF sob vácuo, a resina foi lavada com éter dietílico, seca ao ar e extraída com 2 x 50 ml de ácido acético glacial, o qual foi liofilizado para originar o péptido em bruto. O produto em bruto foi purificado por filtração em gel em Sephadex® G-15, utilizando ácido acético aquoso a 10% como eluente, produzindo o composto do título.

-176-

Exemplo 138

Preparação de (2R,5S)-benziloxicarbonilalanilalanil-(2-(fenilmetil)-5-amino-6-fenil-trans-hex-3-enoil)-valil-valinamida

O composto do Exemplo 137 foi dissolvido em DMF, ao qual foram adicionados 2 equiv. de trietilamina e 1,5 equiv. de N-(benziloxicarboniloxi)succinimida. A extensão da reacção foi monitorizada por HPLC e o produto foi purificado directamente a partir da mistura reaccional por HPLC preparativa, utilizando um sistema de acetonitrilo-água-ácido trifluoroacético a 0,1% numa coluna Hamilton PRP-1® de polistireno.

Exemplo 139

Preparação de ácido (6S)-6-(terc-butiloxicarbonil)amino-7-fenil-5-oxo-heptanóico

Utilizando o processo do Exemplo 12, excepto substituindo por 5-bromo-1-penteno o 4-bromo-1-buteno, foi preparado o composto do título.

Utilizando os processos detalhados aqui descritos nos Exemplos 19, 34, 76, 77, 78, 88 e 135, foram preparados os compostos específicos seguintes:

- a) éster de metilo de (5S,6S)-6-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-7-fenil-5-hidroxi-(1-oxo)heptil-valil valina;
- b) éster de metilo de (5S,6S)-6-(carbobenziloxi-alanil)amino-7-fenil-5-hidroxi-(1-oxo)heptil-valil valina;
- c) (5S,6S)-6-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-7-fenil-5-hidroxi-(1-oxo)heptil-valil valinamida;
- d) (5S,6S)-6-(carbobenziloxi-alanil)amino-7-fenil-5-hidroxi-(1-oxo)heptil-valil valinamida;
- e) (5S,6S)-6-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-7-fenil-5-hidroxi-(1-oxo)heptil-valil valinol;
- f) (5S,6S)-6-(carbobenziloxi-alanil)amino-7-fenil-5-hidroxi-(1-oxo)heptil-valil valinol;
- g) (5S,6S)-6-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-7-fenil-



-177-

-5-hidroxi-(1-oxo)heptil-valil valino-((S)-1-amino-3-metilbutil-2-)amida; e

h) (5S,6S)-6-(carbобензилокси-аланил)амино-7-фенил-5-гидрокси-(1-oxo)heptil-valil valino-((S)-1-amino-3-metilbutil-2-)-amida.

Exemplo 140

Utilizando o processo do Exemplo 151 para preparar o ácido (2R,5S)-2-metil-5-(terc-butiloxicarbonil)амино-6-фенил-4-oxo-hexanóico e empregando os processos detalhados aqui descritos nos Exemplos 19, 34, 76, 77, 78, 88 e 135, foram preparados os compostos específicos seguintes:

a) Éster de metilo de (2R,4S,5S)-5-(carbобензилокси-аланилаланил)амино-6-фенил-4-гидрокси-2-metil-(1-oxo)hexil-valil valina;

b) (2R,4S,5S)-5-(carbобензилокси-аланилаланил)амино-6-фенил-4-гидрокси-2-metil-(1-oxo)hexil-valil valinamida;

c) (2R,4S,5S)-5-(carbобензилокси-аланил)амино-6-фенил-4-гидрокси-2-metil-(1-oxo)hexil-valil valinamida;

d) (2R,4S,5S)-5-(carbобензилокси-аланилаланил)амино-6-фенил-4-гидрокси-2-metil-(1-oxo)hexil-valil valinol;

e) (2R,4S,5S)-5-(carbобензилокси-аланил)амино-6-фенил-4-гидрокси-2-metil-(1-oxo)hexil-valil valinol;

f) (2R,4S,5S)-5-(carbобензилокси-аланилаланил)амино-6-фенил-4-гидрокси-2-metil-(1-oxo)hexil-valil valino-((S)-1-amino-3-metilbutil-2-)amida;

g) (2R,4S,5S)-5-(carbобензилокси-аланил)амино-6-фенил-4-гидрокси-2-metil-(1-oxo)hexil-valil valino-((S)-1-amino-3-metilbutil-2-)amida;

h) (2R,4S,5S)-5-(carbобензилокси-аланилаланил)амино-6-фенил-4-гидрокси-2-metil-(1-oxo)hexil-valil valina; e

i) (2R,4S,5S)-5-(carbобензилокси-аланил)амино-6-фенил-4-гидрокси-2-metil-(1-oxo)hexil-valil valina.

-178-

Exemplo 141Preparação de ácido (2R,5S)-2-benzil-5-(terc-butiloxicarbonil)-amino-6-fenil-4-oxo-hexanóico

Utilizando o processo do Exemplo 151, excepto pela utilização de 3-bromo-2-fenilmetil-1-benziloxipropano em vez de 3-bromo-2-metil-1-benziloxipropano, foi preparado o composto do título.

Utilizando ácido (2R,5S)-2-benzil-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-6-fenil-4-oxo-hexanóico e empregando os processos detalhados aqui descritos nos Exemplos 19, 34, 76, 77, 78, 88 e 135, foram preparados os compostos específicos seguintes:

a) éster de metilo de (2R,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-2-benzil-(1-oxo)hexil-valil valina;

b) éster de metilo de (2R,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-2-benzil-(1-oxo)hexil-valil valina;

c) (2R,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-2-benzil-(1-oxo)hexil-valil valinamida;

d) (2R,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-2-benzil-(1-oxo)hexil-valil valinamida;

e) (2R,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-2-benzil-(1-oxo)hexil-valil valinol;

f) (2R,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-2-benzil-(1-oxo)hexil-valil valinol;

g) (2R,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-2-benzil-(1-oxo)hexil-valil valino-((S)-1-amino-3-metilbutil-2-)amida;

h) (2R,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-2-benzil-(1-oxo)hexil-valil valino-((S)-1-amino-3-metilbutil-2-)amida;

i) (2R,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-2-benzil-(1-oxo)hexil-valil valina; e

j) (2R,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-2-benzil-(1-oxo)hexil-valil valina.

Exemplo 142Preparação de ácido (3RS,5S)-3-isobutil-5-(terc-butiloxicarbonil)-amino-6-fenil-4-oxo-hexanóico4-hidroxi-6-metil-hept-1-eno

a) A uma solução de isobutiraldeído (1,0 g, 11,6 mmol) em THF anidro (30 ml), a 0°C, foi adicionado brometo de alilmagnésio (12,2 mmol). Após a adição, a reacção foi deixada aquecer até à temperatura ambiente e foi agitada durante mais 2 h. A reacção foi rapidamente arrefecida ao ser vertida numa mistura, sob agitação, de HCl a 5% e éter dietílico. A camada orgânica foi separada, lavada com água e salmoura e seca sobre $MgSO_4$. A filtração e a evaporação do solvente produziram o composto do título.

4-bromo-6-metil-hept-1-eno

b) O composto do Exemplo 142(a) (0,6 g, 0,625 mmol) foi dissolvido em CH_2Cl_2 (25 ml) e tratado com cloreto de mesilo (0,72 g, 0,625 mmol) e trietilamina (0,63 g, 0,625 mmol), em cloreto de metileno. Após agitação durante 3 h à temperatura ambiente, a reacção foi vertida em HCl a 5% frio e éter dietílico.

O exame minucioso extractivo padrão forneceu o mesilato em bruto. O mesilato em bruto foi tratado com um excesso de LiBr (3 equiv.) em DMF seco, a 120°C durante 6 h. A reacção foi arrefecida e a mistura reaccional foi diluída com água. O exame minucioso extractivo padrão com pentano produziu o composto do título, o qual foi purificado por destilação.

ácido (3RS,5S)-3-isobutil-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-6-fenil-4-oxo-hexanóico

c) Utilizando o processo do Exemplo 12, excepto substituindo por 4-bromo-6-metil-hept-1-eno o 4-bromo-1-buteno, produziu-se o composto do título.

Utilizando os processos detalhados aqui descritos nos Exemplos 19, 34, 76, 77 e 78, foram preparados os compostos específicos seguintes:

-180-

al) éster de metilo de (3SR,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-3-isobutil-(1-oxo)hexil-valil valina;

bl) éster de metilo de (3SR,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-3-isobutil-(1-oxo)hexil-valil valina;

cl) (3SR,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-3-isobutil-(1-oxo)hexil-valil valinamida; e

dl) (3SR,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-3-isobutil-(1-oxo)hexil-valil valinamida.

Exemplo 143

Preparação de ácido (3RS,5S)-3-metil-5-(terc-butiloxicarbonil)-amino-6-fenil-4-oxo-hexanóico

Utilizando o processo do Exemplo 142, excepto substituindo por acetaldeído o isobutiraldeído, foi preparado o composto do título.

Utilizando os processos detalhados aqui descritos nos Exemplos 19, 34, 76, 77 e 78, foram preparados os compostos específicos seguintes:

a) éster de metilo de (3SR,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-3-metil-(1-oxo)hexil-valil valina;

b) éster de metilo de (3SR,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-3-metil-(1-oxo)hexil-valil valina;

c) (3SR,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-3-metil-(1-oxo)hexil-valil valinamida; e

d) (3SR,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-3-metil-(1-oxo)hexil-valil valinamida.

Exemplo 144

Preparação de ácido (3RS,5S)-3-benzil-5-(terc-butiloxicarbonil)-amino-6-fenil-4-oxo-hexanóico

Utilizando o processo do Exemplo 142, excepto subs-

-181-

tituindo por fenilacetaldeído o isobutiraldeído, foi preparado o composto do título.

Utilizando os processos detalhados aqui descritos nos Exemplos 19, 34, 76, 77 e 78 foram preparados os compostos específicos seguintes:

a) éster de metilo de (3SR,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-3-benzil-(1-oxo)hexil-valil valina;

b) éster de metilo de (3SR,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-3-benzil-(1-oxo)hexil-valil valina;

c) (3SR,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-3-benzil-(1-oxo)hexil-valil valinamida; e

d) (3SR,4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanil)amino-6-fenil-4-hidroxi-3-benzil-(1-oxo)hexil-valil valinamida.

Exemplo 145

Preparação de ácido (5S)-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-5-fenil-4-oxo-pentanóico

Utilizando o processo do Exemplo 12, excepto substituindo por Boc-fenilglicina a Boc-fenilalanina, foi preparado o composto do título.

Utilizando os processos detalhados aqui descritos nos Exemplos 34, 76, 77 e 78, foram preparados os compostos específicos seguintes:

a) éster de metilo de (5S,4S)-5-(carbobenziloxi-alanilalanil)amino-5-fenil-4-hidroxi-(1-oxo)pentil-valil valina; e

b) éster de metilo de (5S,4S)-5-(carbobenziloxi-alanil)amino-5-fenil-4-hidroxi-(1-oxo)pentil-valil valina.

Exemplo 146

Preparação de ácido (5S)-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-7-fenil-4-oxo-heptanóico

Utilizando o processo do Exemplo 12, excepto substituindo

-182-

tuindo por Boc-homofenilalanina a Boc-fenilalanina, foi preparado o composto do título.

Utilizando os processos detalhados aqui descritos nos Exemplos 34, 76, 77 e 78, foram preparados os compostos específicos seguintes:

a) éster de metilo de (4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanil-alanil)amino-7-fenil-4-hidroxi-(1-oxo)heptil-valil valina; e

b) éster de metilo de (4S,5S)-5-(carbobenziloxi-alanil)-amino-7-fenil-4-hidroxi-(1-oxo)heptil-valil valina.

Exemplo 147

Preparação de (5S)-5-(carbobenziloxialanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valina, isobutil amida

(5S)-5-(terc-butiloxi)amino-1,4-dioxo-6-fenil-hexil-valina, isobutilamida

a) Uma solução do composto do Exemplo 12(b) (1,0 mmol) e NMM (1,2 mmol) em THF (5 ml), a -40°C, foi tratada, gota a gota, com cloroformato de isobutirilo (1,0 mmol). Após 15 min, foi adicionada uma solução de L-valina isobutilamida (1,2 mmol) em DMF (2 ml). A mistura foi agitada com aquecimento até à temperatura ambiente durante toda a noite, sendo, em seguida, vertida em HCl aquoso a 4% e extraída com CHCl_3 . A camada orgânica foi lavada com NaHCO_3 a 5%, em seguida com H_2O , e concentrada, produzindo o composto do título.

(5S)-5-(terc-butiloxicarbonil)-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valina, isobutil amida

b) O produto do Exemplo 147(a) foi reduzido com NaBH_4 (1 equiv.) em metanol. Foi adicionado HCl diluído e o produto foi isolado por extração com CHCl_3 . HPLC preparativa em sílica, utilizando um sistema de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, produziu o composto do título, em conjunto com o seu epímero hidroxi.

(5S)-5-amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valina, isobutil amida

c) O produto do Exemplo 147(b) foi dissolvido num volume mínimo de TFA puro. Após 5 min, foi adicionado metanol, seguido

-183-

por 1 equivalente de HCl concentrado. Os solventes foram removidos in vacuo, produzindo o composto do título.

(5S)-5-(carbобензилоксиаланил)амино-4-гидрокси-1-оксо-6-фенил-гексил-валина, изобутил амида

d) Uma solução de Cbz-alanina (0,50 mmol) e NMM (0,60 mmol) em THF (5 ml), a -40°C, foi tratada, gota a gota, com cloroformato de isobutirilo (0,50 mmol). Após 15 minutos, foi adicionado mais NMM (0,60 mmol), seguido por uma solução do produto do Exemplo 147(c) (0,60 mmol) em DMF (2 ml). A mistura foi deixada aquecer até à temperatura ambiente, com agitação, durante toda a noite. Foi adicionado HCl a 5% e o produto foi isolado por extração com CHCl₃.

Exemplo 148

Preparação de (5S)-5-(carbобензилоксиаланил)амино-4-гидрокси-1-оксо-6-фенил-гексил валина, изобутил амида

O composto do título foi preparado tal como descrito no Exemplo 147(d), excepto por ter sido utilizada Cbz-alanilalanina (0,50 mmol) em lugar da Cbz-alanina.

Exemplo 149

Preparação de 5-(miristil)амино-4-гидрокси-1-оксо-6-фенил-гексил валина, изобутил амида

A uma solução do produto do Exemplo 147(c) (0,10 mmol) em piridina (2 ml), foi adicionado anidrido mirístico (0,12 mmol). Após 12 horas, a solução foi diluída com HCl a 10% e extraída com acetato de etilo. A camada orgânica foi lavada com NaHCO₃ a 5% e H₂O, sendo, em seguida, concentrada para originar o composto do título.

Exemplo 150

Preparação de 5-(estearil)амино-4-гидрокси-1-оксо-6-фенил-гексил валина, изобутил амида

O composto do título foi preparado tal como no Exemplo 149, excepto substituindo por anidrido esteárico o anidrido mirístico.

-184-

Exemplo 151

Preparação de 5-(carbобенziloxialanil)amino-4-hidroxi-2-metil-1-oxo-6-fenil-hexilvalil valina, éster de metilo

5-(terc-butiloxicarbonil)amino-4-oxo-2-metil-6-fenil-1-benziloxi hexano

a) O composto do título foi preparado tal como no processo do Exemplo 12(a), excepto que em vez de 4-bromo-1-buteno foi utilizado o 3-bromo-2-metil-1-benziloxi-propano (J. Med. Chem. 30, 374 (1987)).

5-(terc-butiloxicarbonil)amino-4-oxo-2-metil-1-hidroxi-6-fenil hexano

b) O composto do título foi preparado por hidrogenólise do produto do Exemplo 151(a) utilizando o processo do Exemplo 86(b).

ácido 5-(terc-butiloxicarbonil)amino-4-oxo-2-metil-6-fenil-hexanóico

c) A uma mistura do produto do Exemplo 151(b) e benzeno/ H_2O /AcOH 5:1:1 foi adicionado $(n-Bu)_4NBr$ (0,01 equiv.). Foi adicionado $KMnO_4$ (3,5 eq.) e a mistura foi agitada durante 2 horas, sendo, em seguida, adicionado bi-sulfeto de sódio aquoso saturado. Após vários minutos, a mistura foi acidificada até pH 1-2 com $KHSO_4$ aquoso saturado, sendo, em seguida, extraída com EtOAc. A camada orgânica foi concentrada e o resíduo foi purificado por cromatografia em sílica (acetato de etilo/hexano/HOAc), produzindo o composto do título.

5-(carbобенziloxi alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexilvalil valina, éster de metilo

d) O composto do Exemplo 151(c) foi acoplado a éster de metilo de valil valina utilizando o método do Exemplo 35(a) excepto substituindo pelo composto do Exemplo 151(c) o ácido 5-(terc-butiloxicarbonil)amino-4-oxo-6-(4-benziloxi-fenil)hexanóico. A cetona foi reduzida com $NaBH_4$ utilizando o processo do Exemplo 84(b). O grupo amino foi desprotegido pelo processo do

-185-

Exemplo 35(c), e acoplado à Cbz-alanina pelo processo do Exemplo 72(a), para produzir o composto do título.

Exemplo 152

Preparação de 7-metil-5-(carbobenziioxialanil)amino-3,4-di-hidroxi-2-fenilmetil-1-oxo-octil valina, isobutilamida

ácido 7-metil-4,5-D,(terc-butiloxicarbonil)-N-isopropilideno-3-hidroxi-2-fenilmetil-octanóico, éster de benzilo

a) Uma solução de 2,2-dimetil-3-(terc-butiloxi carbonil)-4-isopropil-5-formil-1,3-oxazolidina (1,0 mmol) (J. Med. Chem. 30, 976 (1987)) em THF (2 ml) foi adicionada a uma solução a -78º de 1,1 mmol de benzil-3-fenilpropionato de lítio (preparado a partir de diisopropilamida de lítio (1,1 mmol) e de benzil-3-fenilpropionato (1,1 mmol)). A mistura foi agitada a -78º durante 1 hora, sendo, em seguida, deixada aquecer até à temperatura ambiente e diluída com tampão fosfato de pH 7. A mistura foi extraída com clorofórmio, a camada orgânica foi concentrada, e o resíduo foi purificado por cromatografia flash, produzindo o composto do título como uma mistura de isômeros.

ácido 7-metil-5-(terc-butiloxicarbonil)amino-3,4-dioxiisopropilideno-2-fenilmetil-octanóico, éster de benzilo

b) Uma solução do produto do Exemplo 152(a) (0,5 mmol) em CH₂Cl₂ (10 ml) foi agitada com ácido canforsulfônico (0,1 mmol), durante toda a noite. Foi adicionado NaHCO₃ sólido em excesso com acetano (10 ml), a mistura foi agitada vigorosamente durante 1 hora e filtrada através de Celite. A concentração e a cromatografia flash produziram o composto do título.

ácido 7-metil-5(terc-butiloxicarbonil)amino-3,4-dioxiisopropilideno-2-fenilmetil-octanóico

c) Uma solução do produto do Exemplo 152(b) (0,2 mmol) em metanol (5 ml) foi agitada com Pd a 10% em carbono ativado (20 mg), durante 8 horas sob $1,013 \times 10^5$ Pa de H₂. A mistura foi filtrada através de Celite e concentrada, produzindo o composto do título.

7-metil-5(terc-butiloxiamino)-3,4-dioxi-isopropilidino-2-fenilmetil-1-oxo-octil valina, isobutil amida

d) O composto do título foi preparado pelo processo do Exemplo 87(a), excepto substituindo pelo produto do Exemplo 152(c) o ácido 5-(terc-butiloxicarbonil)amino-4-oxo-6-fenilhexanóico e eliminando a lavagem com HCl a 5% no exame minucioso.

7-metil-5-amino-3,4-di-hidroxi-2-fenilmetil-1-oxo-octil valina, isobutil amida, cloridrato

e) O composto do título foi preparado a partir do produto do Exemplo 152(d) pelo processo do Exemplo 147(c).

7-metil-5-(carbобензилloxialanil)amino-3,4-di-hidroxi-2-fenilmetil-1-oxo-octil valina, isobutil amida

f) O composto do título foi preparado pelo processo do Exemplo 147(d), excepto substituindo pelo produto do Exemplo 152(e).

Exemplo 153

Preparação de (4S,5S)-5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)-hexil-valil valinol

(4S,5S)-5-(carbобензилoxi-alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-benziloxifenil)-hexil-valil valina

a) O composto do Exemplo 72(a) (1 mmol) foi dissolvido em metanol (10 ml) e hidróxido de potássio (1,5 mmol) em H₂O foi adicionado gota a gota. A reacção foi monitorizada por cromatografia de camada fina até a hidrólise do éster estar completa. A reacção foi neutralizada com HCl a 5%, o metanol foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em CHCl₃. O extracto orgânico foi lavado com HCl a 5% e água e seco sobre MgSO₄. A filtração e a evaporação do solvente forneceram o composto do título.

(4S,5S)-5-(carbобензилoxi-alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-benziloxifenil)-hexil-valil valinol

b) Uma solução do composto do Exemplo 153(a) (0,5 mmol) foi dissolvida em CH₂Cl₂ (5 ml) sob uma atmosfera de Ar e arrefe-

-187-

cida até 0°C. Foi adicionado metil sulfeto de borano (0,55 mmol), gota a gota. A reacção foi agitada 5 horas a 5°C e 2 horas à temperatura ambiente. Foi adicionado metanol (3 ml), seguido por ácido acético (2 ml) e a solução foi agitada à temperatura ambiente durante mais 2 horas. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida, o resíduo foi dissolvido em CHCl_3 e lavado sucessivamente com HCl a 5%, H_2O e NaHCO_3 a 5%. O extracto orgânico foi seco sobre MgSO_4 , filtrado e o solvente foi evaporado, produzindo o composto do título.

(4S,5S)-5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)-hexil-valil valinol

c) A uma solução do composto do Exemplo 153(b) (0,2 mmol) em ácido acético, foi adicionado paládio a 10% (150 mg) em carbono activado. Foi borbulhado hidrogénio através da mistura durante 60 min e a reacção foi agitada sob uma atmosfera de hidrogénio durante 20 horas. A suspensão foi filtrada através de Celite® e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, produzindo o composto do título.

Exemplo 154

Preparação de 4-metil-3-[5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)-hexil-valil]amino-pentano-2-ona

4-metil-3-[5-(carbобензилокси-аланилаланил)амино-4-гидрокси-1-оксо-6-(4-бензилоксифенил)-гексил-валил]амино-пентано-2-она

a) O composto do Exemplo 153(a) (0,2 mmol) foi dissolvido em cloreto de metileno (4 ml), a 0°C, e cloreto de oxalilo (0,25 mmol) foi adicionado seguido por 1 gota de DMF. Após agitação durante 0,5 horas a 0°C e 0,5 horas à temperatura ambiente, uma solução de cloreto de metileno foi adicionada, gota a gota, a uma solução de um excesso de diazometano (>4 mmol) numa mistura de Et_2O e THF. Após agitação a 10°C durante 1 hora, foi adicionado o ácido acético até que a evolução do azoto cessasse. Os solventes foram evaporados, o resíduo foi dissolvido em CHCl_3 , lavado com água e seco sobre MgSO_4 . A filtração e a evaporação do solvente produziu o composto do título.

-188-

4-metil-3-[5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)-hexil-valil]amino-pentano-2-ona

b) A uma solução do composto do Exemplo 154(a) (0,1 mmol) em ácido acético, foi adicionado paládio a 10% (80 mg) em carbono activado. Foi borbulhado hidrogénio através da mistura durante 60 min e a reacção foi agitada sob uma atmosfera de hidrogénio durante 20 horas. A suspensão foi filtrada através de Celite® e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida para produzir o composto do título.

Exemplo 155

Preparação de Ac-Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂

Utilizando o processo do Exemplo 1, excepto substituindo por Boc-Phe o Boc-Tyr(BrZ), foi preparado o composto do título.

Exemplo 156

Utilizando o processo do Exemplo 58, excepto substituindo por Boc-His(Tos), Boc-Val, Boc-Ile, Boc-Lys(Clz), Boc-Ser(Bzl), Boc-D-Arg(Tos) ou Boc-Met a Boc-Ala, produziram-se os seguintes péptidos:

His-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂;
Val-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂;
Ile-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂;
Lys-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂;
D-Arg-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂;
Ser-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂; e
Met-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂.

Exemplo 157

Utilizando o processo do Exemplo 39, excepto por se iniciar a sequência com Boc-Ala-BHA, Boc-Gly-BHA, Boc-Ile-BHA, Boc-Leu-BHA ou Boc-Met-BHA, produziram-se os seguintes péptidos:

-189-

Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Ala-NH₂;
Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Gly-NH₂;
Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Ile-NH₂;
Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Leu-NH₂; e
Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Val-Met-NH₂.

Exemplo 158

Utilizando o processo do Exemplo 39, excepto substituído por Boc-Ala, Boc-Gly, Boc-Ile, Boc-Arg(Tos), Boc-Leu ou Boc-Met a Boc-Val no segundo resíduo do péptido, produziram-se os seguintes péptidos:

Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ala-Val-NH₂;
Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Gly-Val-NH₂;
Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-NH₂;
Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Arg-Val-NH₂;
Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Leu-Val-NH₂; e
Ac-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Met-Val-NH₂.

Exemplo 159

Utilizando o processo do Exemplo 40, excepto substituído por Boc-His(Tos), Boc-Val, Boc-Ile, Boc-Leu, Boc-Thr(Bzl) ou Boc-Gln a Boc-Ala no quinto resíduo do péptido, produziram-se os seguintes péptidos:

Ac-Ser-Ala-His-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂;
Ac-Ser-Ala-Val-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂;
Ac-Ser-Ala-Leu-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂;
Ac-Ser-Ala-Thr-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂; e
Ac-Ser-Ala-Gln-Tyr-Pro-Val-Val-NH₂.

Exemplo 160

Preparação de (5S,4RS)-5-(terc-butoxicarbonilserilalanilalanil)-amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina

O composto do Exemplo 34(d) (50 mg, $6,5 \times 10^{-5}$ mole) foi dissolvido em metanol (5 ml) e água (1 ml) contendo carbonato de potássio foi adicionada, gota a gota. Após agitação durante 6 horas à temperatura ambiente, a mistura reaccional foi diluída com

-190-

acetato de etilo e água. O pH foi ajustado para 3,0 com HCl dil., e a camada aquosa foi separada. A camada orgânica foi lavada com água (1x) e seca sobre $MgSO_4$. A filtração e a evaporação do acetato de etilo produziram o composto do título.

Exemplo 161

Preparação de (5S,4RS)-5-[(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)-amino]-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina-dietil-amida

O composto do Exemplo 160 (60 mg, $7,8 \times 10^{-5}$ mole) foi dissolvido em THF anidro (4 ml), a $-40^\circ C$ sob uma atmosfera de argônio e foi adicionada N-metil morfolina (10,2 mg, $1,01 \times 10^{-4}$ mole), seguida por cloroformato de isobutirilo (11 mg, $7,8 \times 10^{-5}$ mole). Após agitação durante 15 min, foi adicionada dietilamina (11 mg, $1,56 \times 10^{-4}$ mole). Após agitação durante mais 30 min a $-40^\circ C$, a mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente. A reacção foi diluída com acetato de etilo e lavada sucessivamente com HCl a 5%, bicarbonato de sódio a 5% e salmoura. O extrac-to orgânico foi seco sobre $MgSO_4$, filtrado e evaporado in vacuo, para produzir o composto do título.

Utilizando o mesmo processo, excepto substituindo por n-butilamina a dietilamina, foi produzida a (5S,4RS)-5-[(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino]-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina-butilamida.

Exemplo 162

Preparação de (5S,4RS)-5-[(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino]-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil valina-isobutilamida

éster de metilo de (5S,4RS)-5-[(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino]-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil valina

a) Utilizando o processo do Exemplo 34, excepto substituindo por éster de metilo de valina o éster de metilo de valil valina, foi produzido o composto do título.

-191-

(5S,4RS)-5-[(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino]-4-
-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil valina

b) Utilizando o processo do Exemplo 160, excepto substituindo pelo péptido do Exemplo 162(a), foi produzido o ácido carboxílico do título.

(5S,4RS)-5-[(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino]-4-
-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil valina-isobutilamida

c) Utilizando o péptido do Exemplo 162(b) e o processo do Exemplo 161, excepto substituindo por isobutilamina e dietilamina, foi produzido o composto do título.

Exemplo 163

Composição para unidade de dosagem lipossómica

Fosfatidilcolina (1,4 g) e fosfatidilglicerol (0,6 g) são dissolvidos em 300 ml de metanol a 20% no solvente clorofórmio e são evaporados até à secura. A solução do péptido (30 mg em 200 ml de solução salina tamponada com fosfato) é adicionada à película fosfolipídica seca, a qual é deixada equilibrar à temperatura ambiente durante 1-2 horas. A dispersão lipossómica formada é então submetida a turbilhonamento para assegurar uma mistura uniforme. A suspensão resultante é extrusada, cinco vezes, através de um filtro de policarbonato de 0,2 μ , para produzir uma distribuição de tamanhos uniforme. Se necessário, a suspensão pode ser dialisada ou ultracentrifugada para remover o péptido não-encapsulado.

Exemplo 164

Composição para unidade de dosagem lipossómica

Num béquer, colesterol (49 mg) e ácido oleico (0,358 g) são aquecidos até 65°C durante 20-30 min. Mantendo a temperatura, fosfolípidos (1 g) são adicionados lentamente, assegurando o humedecimento completo pelo ácido oleico. Uma solução de arginina (0,22 g em 3,37 g de água) a 40°C é adicionada em pequenas alíquotas e meticulosamente misturada na pasta. A mistura é mantida a

-192-

40°C. Após equilíbrio durante uma semana, o péptido (150 mg) é meticulosamente misturado no gel. O pH é ajustado até 7,0 com ácido acético, se necessário. É adicionada solução salina tampoadada com fosfato (pH 7,4), em pequenas alíquotas, com turbilhamento, para atingir uma concentração de 200 mg de gel lipossômico por ml. Os lipossomas formam-se espontaneamente. Este processo produz 5 g de suspensão lipossômica. Uma unidade de dosagem padrão é de 1 g de suspensão lipossômica.

Exemplo 165

Composição para unidade de dosagem parentérica

Uma preparação que contém 25 mg do péptido de acordo com este invento é preparada como se segue.

25 mg do péptido são dissolvidos em 15 ml de água destilada. A solução é filtrada, sob condições estéreis, para uma ampola multi-dose de 25 ml e liofilizada. Para injeção intravenosa ou intramuscular, o pó é reconstituído pela adição de 20 ml de dextrose a 5% em água (D5W). Esta solução também é apropriada para utilização noutros métodos de administração. Tais como adição a uma garrafa ou saco para infusão EV, gota a gota.

Exemplo 166

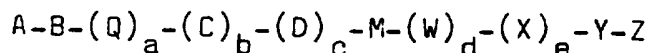
Composição para unidade de dosagem oral

Uma cápsula para administração oral é preparada por mistura e trituração de 35 mg do péptido com 75 mg de lactose e 5 mg de estearato de magnésio. O pó resultante foi peneirado e colocado dentro de cápsulas de gelatina dura.

A descrição acima descreve completamente como fazer e utilizar este invento. Este invento, contudo, não está limitado às concretizações precisas aqui descritas, mas abrange todas as modificações dentro do âmbito das reivindicações que se seguem.

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo para a preparação de um composto de fórmula



(I)

e dos seus sais farmaceuticamente aceitáveis,
em que,

A é BocNH, CbzNH, H, R'R"N, R"CONR' ou DnsNH, ou se a, b e c são 0 e Y é uma ligação covalente, então A é H, Boc, Cbz, R" ou R"CO;

B é um ou mais aminoácidos D ou L, β -Ala ou é uma ligação covalente;

C e D são iguais ou diferentes e são Glx, Asx, Ala, β -Ala, Arg, Gly, Ile, Leu, Lys, Ser, Thr, Val, Met ou His;

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

W é Pro ou Δ 3-desidro-Pro;

X é Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Met, Lys, Glx ou Asx;

Y é um ou mais aminoácidos D ou L, ou é uma ligação covalente;

Z é CO_2R''' , $CONR'R'''$, COR' , CH_2OH , $CH_2NR'R'''$ ou H, ou se d e e são 0 e Y é uma ligação covalente, Z é OR''' ou $NR'R'''$;

a, b, c, d e e são cada um, independentemente uns dos outros, 0 ou 1, desde que c e e não sejam simultaneamente 0;

M é Cha, $Phe(4'R_a)$ ou $-NHCHR_1R_2-$;

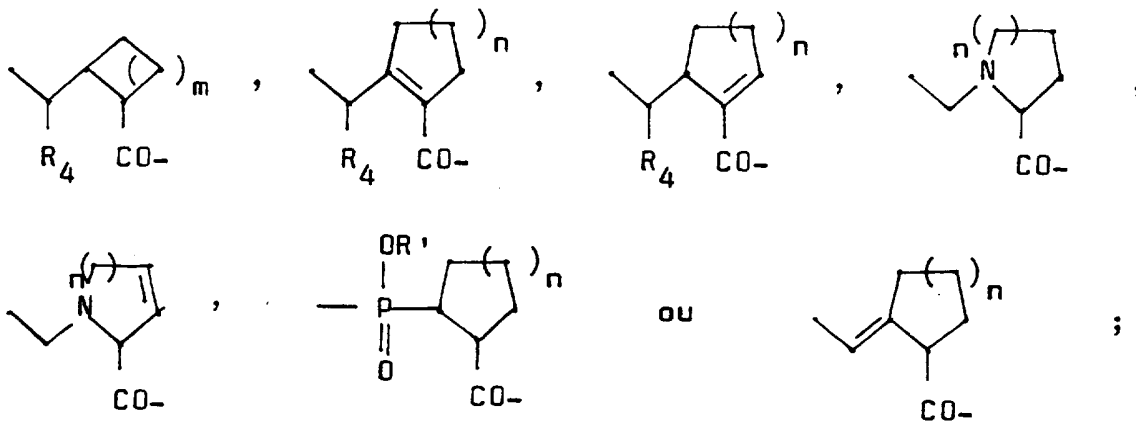
em que:

R_1 é, independentemente, $AlqC_{1-5}$, $(CH_2)_nSA1qC_{1-5}$, $(CH_2)_nOA1qC_{1-5}$, $(CH_2)_n$ cicloalquilo C_{3-7} ou $(CH_2)_mC_6H_4-R_a$;

R_a é halogéneo, OR' , NO_2 , NH_2 ou H;

R_2 é $(CH_2)_n-$, $CHR_3(CH_2)_mCO-$, $CO(CH_2)_mCO-$, CHR_3CHR_3 , $(CH_2)_mCO-$,

$\text{CHR}_3\text{CHR}_3, \text{CHR}_1(\text{CH}_2)_m\text{CO}-, \text{CHR}_3\text{CHR}_1\text{CHR}'(\text{CH}_2)_m\text{CO}-, \text{CHR}_3\text{CHR}'\text{CHR}_1(\text{CH}_2)_m\text{CO}-,$
 $\text{COCR}_1\text{CHR}'(\text{CH}_2)_m\text{CO}-, \text{COCF}_2\text{CR}'\text{R}''(\text{CH}_2)_m\text{CO}-, \text{COCF}_2(\text{CH}_2)_m\text{CO}-,$
 $\text{CH}=\text{CR}'\text{CHR}''(\text{CH}_2)_m\text{CO}-, \text{COCH}=\text{CR}'(\text{CH}_2)_m\text{CO}-,$
 $\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_p\text{CHR}'(\text{CH}_2)_m\text{CO}-, \text{CH}_2\text{NR}'\text{CHR}''(\text{CH}_2)_m\text{CO}-,$
 $\text{P}=\text{O}(\text{OR}')(\text{CH}_2)_m\text{CO}-,$



R_3 e R_3 , são, cada um deles independentemente, OH, H ou NH_2 ;

R_4 é OH, H, NH_2 ou $=\text{O}$;

m é, independentemente, 0, 1, 2 ou 3;

n é, independentemente, 1 ou 2,

p é 0, 1 ou 2;

R' é H ou AlqC_{1-5} ;

R'' é H ou AlqC_{1-18} ;

R''' é H, AlqC_{1-5} , cicloalquilo C_{3-6} , $(\text{CH}_2)_n\text{C}_6\text{H}_5$, $(\text{CH}_2)_n\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$, $(\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, ou $(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$;

caracterizado por compreender, (a) acoplar os resíduos de aminoácidos apropriados, (b) remover facultativamente quaisquer grupos protectores, e (c) modificar facultativamente o terminal amino ou carboxilo do péptido.

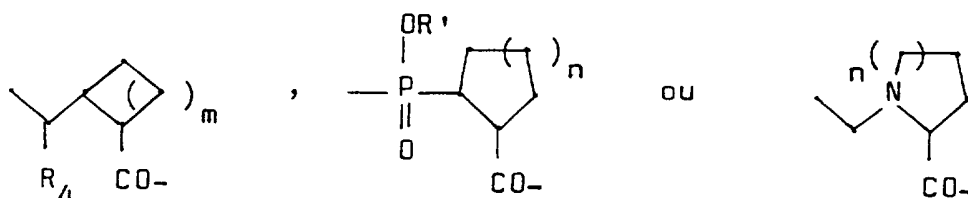
2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracteriza do por B ser um ou dois aminoácidos D ou L escolhidos a partir do grupo constituído por Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, His, Lys, Arg, Glx, Asx, Cys, Ser e Thr, ou ser uma ligação covalente, e Y ser um

a três aminoácidos D ou L escolhidos a partir do grupo constituído por Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Val, Arg, Lys, Thr, Ser, Cys, Glx e Asx ou ser uma ligação covalente.

3 - Processo para a preparação de um composto de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por Q ser um aminoácido D ou L escolhido a partir do grupo constituído por Ser, Thr, Asp e His e D ser escolhido a partir do grupo constituído por Glx, Asx, Ser, Ala, β -Ala, Ile, Leu, Val e Met.

4 - Processo para a preparação de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por d ser O e M ser $\text{-NHCHR}_1\text{R}_2$.

5 - Processo para a preparação de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado por R_1 ser $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{-R}_a$, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_{11}$ ou AlqC_{1-5} , e R_2 ser CHR_3CHR_3 , $(\text{CH}_2)_m\text{CO-}$, CHR_3CHR_3 , $\text{CHR}_1\text{CO-}$, $\text{CHR}_3\text{CHR}_1\text{CHR}'\text{CO-}$, $\text{CHR}_3(\text{CH}_2)_m\text{CO-}$, $\text{CO}(\text{CH}_2)_m\text{CO-}$, $\text{COCR}_1\text{CHR}'(\text{CH}_2)_m\text{CO-}$, $\text{CHR}_3\text{CF}_2(\text{CH}_2)_m\text{CO-}$, $\text{-COCF}_2(\text{CH}_2)_m\text{CO-}$, $\text{-P=P(OR')}(\text{CH}_2)_m\text{CO-}$,



6 - Processo para a preparação de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado por Y ser um aminoácido escolhido a partir do grupo constituído por Ala, Gly, Ile, Met, Asx, Arg e Val ou ser uma ligação covalente e C e D serem escolhidos a partir do grupo constituído por Glx, Asx e Ala.

7 - Processo para a preparação de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado por R_2 ser $\text{CH(OH)CH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$.

8 - Processo para a preparação de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado por B ser uma ligação covalente e a ser O.

9 - Processo para a preparação de um composto de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por b ser 0.

10 - Processo para a preparação de um composto de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por ou c ou e ser 0.

11 - Processo para a preparação de um composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto preparado ser:

2-(acetil-serilglutaminilasparaginil)amino-3-fenilpropilprolilvalil valinamida;

2-(serilglutaminilasparaginil)amino-3-fenilpropilprolilvalil valinamida;

4-(acetil-serilglutaminilasparaginil)amino-3-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentilprolilvalil valinamida;

4-(acetil-serilglutaminilasparaginil)amino-3-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentilvalil valinamida;

4-(seril-glutaminilasparaginil)amino-3(S)-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentilvalil valinamida;

5-(carbобензилокси-аланилаланил)аминo-6-фенил-4-гидрокси-(1-oxo)гексил-валил валинол;

carbобензилокси-аланил-(3-гидрокси-5-аминo-6-фенил)гексаноил-валил-(4-аминoметил)пиридина; ou

5-(carbобензилоксиаланилаланил)аминo-4-гидрокси-6-фенил-(1-oxo)гексил-валина изобутиламиды;

e seus sais farmacologicamente aceitáveis.

12 - Processo para a preparação de um composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o composto preparado ser:

éster metílico de 2- (2-(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino-1-oxo-3-fenilpropil)ciclopentilcarbonilvalil valina;

éster metílico de 2-(2-(serilalanilalanil)amino-1-oxo-3-fenilpropil)ciclopentilcarbonilvalilvalina;

éster metílico 2-(2-(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino-1-hidroxi-3-fenilpropil)ciclopentilcarbonilvalil valina;

éster metílico de 2-(1-hidroxi-3-fenil-2-(serilalanilalanil)aminopropil)ciclopentilcarbonilvalilvalina;

éster metílico de 2-((1-metoxi-1-(2-fenil-1-(terc-butiloxycarbonilserilalanilalanil)amino)etil)fosfinil)ciclopentilcarbonil-valilvalina;

éster metílico de 2-((1-hidroxi-1-(2-fenil-1-(serilalanilalanil)amino)etil)fosfinil)ciclopentilcarbonil-valil valina;

éster metílico de 5-(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina;

éster metílico de 5-(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxi-fenil)hexil-valil valina;

éster metílico de 4-(terc-butoxicarbonil-serilalanilalanil)amino-2,2-difluoro-3-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentil-valil valina;

éster metílico de 4-(serilalanilalanil)amino-2,2-difluoro-3-hidroxi-1-oxo-5-fenilpentil-valil valina;

éster metílico de 4-(serilalanilalanil)amino-2,2-difluoro-1,3-dioxo-5-fenilpentil-valil valina;

5-(t-butiloxycarbonilserilalanilalanil)amino-4-hidroxi-6-(4-hidroxi)fenil-1-oxo-hexil-valil amida;

éster metílico de 5-((carbобензилокси-D-seril)alanilalanil)-amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina;

éster metílico de 5-((D-seril)alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina;

5-(t-butiloxycarbonilserilalanilalanil)amino-6-(4-hidroxi)-fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina;

5-(serilalanilalanil)amino-6-(4-hidroxi)fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina;

éster metílico de 2-((1-hidroxi-2-(serilalanilalanil)amino-3-ciclo-hexil)propil)ciclopentanocarbonil-valil valina;

éster metílico de (4S,5S) 5-(carbобензилоксиalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina;

éster metílico de (4S,5S) 5-(alanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina;

éster metílico de (4S,5S) 5-(terc-butiloxicarbonilalanil)-amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)hexil-valil valina;

éster metílico de (4S,5S) 5-alanilamino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)-hexil-valil valina;

éster metílico de (4S,5S) 5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)hexil-valil valina;

éster metílico de (4S,5S) 5-[(carbобензилоxi-β-alanil)-alanil] amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)hexil-valil valina;

éster metílico de (4S,5S) 5-[(β-alanil)alanil] amino-4-hidroxi-1-oxo-6-(4-hidroxifenil)hexil-valil valina;

éster metílico de (4S,5S) 5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-ciclo-hexil-hexil-valil valina;

éster metílico de (4S,5S) 5-(carbобензилоxi alanilalanil)-amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina;

éster metílico de (4S,5S) 5-(alanilalanil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina;

éster benzílico de (4RS,5S) 5-amino-6-(4-hidroxi)fenil-4-hidroxi-1-oxo-hexil-valil valina;

éster metílico de (1R,2R) 2-(((1S,2S)-1-hidroxi-2-amino-3-ciclo-hexil)propil)ciclopentanocarbonil-valil valina;

éster metílico de (4S,5S) 5-amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina;

éster metílico de (4S,5S) 5-(terc-butiloxicarbonil)amino-4-hidroxi-1-oxo-6-fenil-hexil-valil valina;

éster metílico de (4S,5S) 5-(metoxicarbonil-alanilalanil)-amino-6-fenil-4-hidroxi-(1-oxo)hexil-valil valina; ou

éster metílico de ácido (4RS,5S) 5-((terc-butiloxicarbonil)isoleucil)amino-7-metil-4-hidroxi-1-oxo-octil-leucil-aspartico;

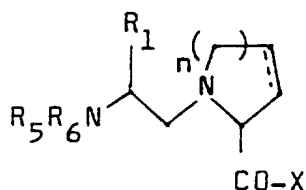
ou suas carboxamidas;

e seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

13 - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado por compreender a mistura de um composto preparado de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-11 com um veículo farmacêuticamente aceitável.

14 - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado por compreender a mistura de um composto preparado de acordo com qualquer uma das reivindicações 4-11, azi dotimidina e um veículo farmacêuticamente aceitável.

15 - Processo para a preparação de um composto de fórmula:



em que:

R_1 é $AlqC_{1-5}$, $-(CH_2)_n SA1qC_{1-5}$, $-(CH_2)_n OA1qC_{1-5}$, $-(CH_2)_n$ cicloalquilo C_{3-7} ou $-(CH_2)_m C_6H_4-R_a$;

R_a é halogéneo, NO_2 , OH , $OA1qC_{1-5}$, NH_2 ou H ;

R_5 é H ;

R_6 é CH_3CO , $AlqC_{1-5}$, Dns , Cbz ou Boc , ou quando tomados em conjunto R_5 e R_6 são ftalimida;

m é, independentemente, 0, 1, 2 ou 3;

n é, independentemente, 0 ou 1;

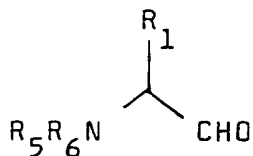
-- indica uma ligação ou simples ou dupla;

X é H , halogéneo, OH , $OA1qC_{1-5}$, $NHR'R''$ ou $OCOAlqC_{1-5}$; e

R' e R'' são H ou $AlqC_{1-5}$,

caracterizado por compreender,

a) a reacção de um composto de fórmula



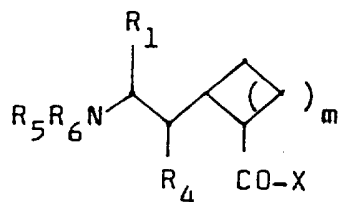
com um éster de prolina, Δ 3-Pro ou 2-carboxipiperidina, sob condições redutoras;

e facultativamente seguida por:

b) conversão do éster num ácido carboxílico, éster ou amida; e

c) conversão do ácido num éster, amida, anidrido ou haleto de acilo.

16 - Processo para a preparação de um composto de fórmula:



em que:

R_1 é AlqC_{1-5} , $-(\text{CH}_2)_n\text{OAlqC}_{1-5}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{cicloalquilo C}_{3-7}$ ou $(\text{CH}_2)_m\text{C}_6\text{H}_4\text{-R}_a$;

R_4 é OH, NH_2 , H ou =O;

R_a é halogéneo, NO_2 , OH, OAlqC_{1-5} , NH_2 ou H;

m é, independentemente, 0, 1, 2 ou 3;

n é 0 ou 1;

R_5 é H;

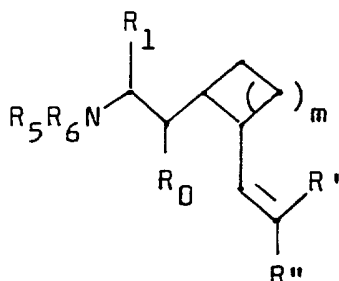
R_6 é CH_3CO , AlqC_{1-5} , Dns, Cbz ou Boc, ou quando tomados em conjunto R_5 e R_6 são ftalimido;

X é H, halogéneo, OH, OAlqC_{1-5} , $\text{NHR}'\text{R}''$ ou OCOAlqC_{1-5} ; e

R' e R'' são H ou AlqC_{1-5} ,

caracterizado por compreender,

a) a oxidação a um ácido ceto-carboxílico, de um composto de fórmula:



em que R_0 é OH ou =O;

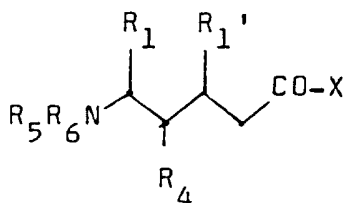
e, em seguida, em qualquer ordem:

b) redução ou aminação redutiva opcionais do grupo ceto;

e

c) conversão opcional do ácido carboxílico num éster, amida, aldeído, anidrido ou haleto de acilo.

17 - Processo para a preparação de um composto de fórmula:



em que:

R_1 é $AlqC_{1-5}$, $-(CH_2)_n OAlqC_{1-5}$, $-(CH_2)_n$ cicloalquilo C_{3-7} ou $-(CH_2)_m C_6H_4-R_a$;

R_1' é H, $AlqC_{1-5}$, $-(CH_2)_n OAlqC_{1-5}$, $-(CH_2)_n$ cicloalquilo C_{3-7} ou $-(CH_2)_m C_6H_4-R_a$;

R_4 é OH, NH_2 , H ou =O;

R_a é halogéneo, NO_2 , OH, $OAlqC_{1-5}$, NH_2 ou H;

m é, independentemente, 0, 1, 2 ou 3;

n é, independentemente, 0 ou 1;

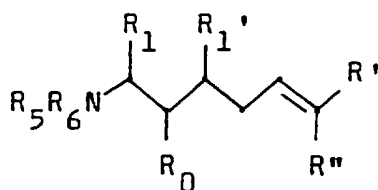
R_5 é H;

R_6 é CH_3CO , AlqC_{1-5} , Dns, Cbz ou Boc, ou quando tomados em conjunto, R_5 e R_6 são ftalimido;

X é H, halogéneo, OH, OAlqC_{1-5} , $\text{NHR}'\text{R}''$ ou OCOAlqC_{1-5} ; e

R' e R'' são H, ou AlqC_{1-5} , desde que R_1 não seja isobutilo; caracterizado por compreender,

a) a oxidação a um ácido carboxílico, de um composto de fórmula:



em que R_0 é OH ou =O;

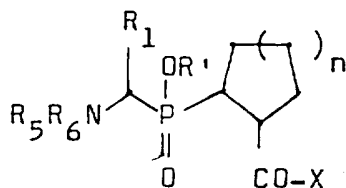
e, em seguida, em qualquer ordem:

b) redução ou aminação redutiva opcionais do grupo ceto;

c) conversão opcional do ácido carboxílico num éster, amida, aldeído, anidrido ou haleto de acilo.

18 - Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por R_1' ser H, R_1 ser $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{-R}_a$ e R_4 ser OH ou =O.

19 - Processo para a preparação de um composto de fórmula:



em que:

R_1 é AlqC_{1-5} , $-(\text{CH}_2)_n\text{OAlqC}_{1-5}$, $-(\text{CH}_2)_n$ cicloalquilo C_{3-7} ou $-(\text{CH}_2)_m\text{C}_6\text{H}_4\text{-R}_a$;

R_a é halogéneo, NO_2 , OH, OAlqC_{1-5} , NH_2 ou H;

m é 0, 1, 2 ou 3;

n é, independentemente, 0 ou 1;

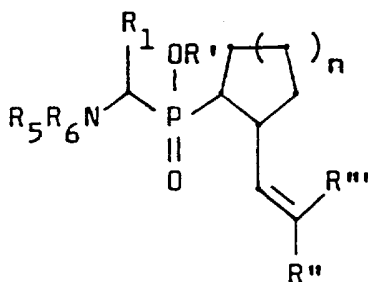
R_6 é CH_3CO , AlqC_{1-5} , Dns, Cbz ou Boc, ou quando tomados em conjunto R_5 e R_6 são ftalimido;

X é H, halogéneo, OH, OAlqC_{1-5} , $\text{NHR}'\text{R}''$ ou OCOAlqC_{1-5} ; e

R' e R'' são H ou AlqC_{1-5} ;

caracterizado por compreender,

a) a oxidação a um ácido carboxílico, de um composto de fórmula:



e, em seguida:

b) hidrólise opcional do fosfinato de alquilo ao ácido fosfínico; e

c) conversão opcional do ácido carboxílico num éster, amida, aldeído, anidrido ou haleto de acilo.

Lisboa, -7 JUL 1992

Por SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION

- O AGENTE OFICIAL -