PT103897

Publication Title:

INIBIDORES DE METALO-ENZIMAS COM POTENCIAL APLICAÃ‡Ãƒ O CLÃ

Abstract:

Abstract of PT 103897

(A) Translate this text A PRESENTE INVENÃ‡Ãƒ O REFERE-SE A NOVOS COMPOSTOS COM ELEVADA CAPACIDADE DE INIBIÃ‡Ãƒ O DE METALOPROTEINASES CONTENDO ZINCO NO CENTRO ACTIVO. OS INIBIDORES AQUI DESENVOLVIDOS POSSUEM UM NOVO TIPO DE GRUPO QUELANTE DO IAO ZINCO(II) NO CENTRO CATALITICO ENZIMÃ

Courtesy of http://v3.espacenet.com

This Patent PDF Generated by Patent Fetcher(R), a service of Stroke of Color, Inc.

(11) Número de Publicação: **PT 103897 A**

(51) Classificação Internacional:
A61K 31/122 (2006.01) ***A61P 43/00*** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2007.11.30**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2008.04.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.12.10**
246/2008

(73) Titular(es):
INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO
GALTEC/GAPI DO IST, AVENIDA ROVISCO PAIS
1049-001 LISBOA PT

(72) Inventor(es):
SÉRGIO M. MARQUES PT
ARMANDO ROSSELLO IT
MARIA AMÉLIA SANTOS PT

(74) Mandatário:

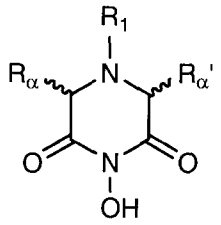
(54) Epígrafe: **INIBIDORES DE METALO-ENZIMAS COM POTENCIAL APLICAÇÃO CLÍNICA: DERIVADOS 1-HIDROXIPIPERAZINO-2, 6-DIONA COMO UM NOVO GRUPO DE LIGAÇÃO AO ZINCO**

(57) Resumo:
A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A NOVOS COMPOSTOS COM ELEVADA CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DE METALOPROTEINASES CONTENDO ZINCO NO CENTRO ACTIVO. OS INIBIDORES AQUI DESENVOLVIDOS POSSUEM UM NOVO TIPO DE GRUPO QUELANTE DO IAO ZINCO(II) NO CENTRO CATALITICO ENZIMÁTICO, DO TIPO 1- HIDROXIPIPERAZINO-2,6--DIONA, UM HETEROCICLO COM UM ANEL DE SEIS MEMBROS. ESTES COMPOSTOS PODEM SER DERIVADOS DO ÁCIDO IMINODIACÉTICO OU DE OUTROS AMINOÁCIDOS, CONTENDO OU NÃO CENTROS DE QUIRALIDADE NUM OU MAIS ÁTOMOS DE CARBONO DO ANEL, E POSSUIR 4-N-SUBSTITUINTES LIPÓFILOS, ADEQUADAMENTE SELECCIONADOS. ESTES NOVOS COMPOSTOS DEMONSTRARAM ELEVADA ACTIVIDADE INIBITÓRIA (DE ORDEM NANOMOLAR) E SELECTIVIDADE COM ALGUMAS METALOPROTEINASES MATRICIAIS (MMPS) E AINDA ESTABILIDADE, PELO QUE APRESENTAM POTENCIALIDADE NA SUA APLICAÇÃO TARMACOLÓGICA.

REIVINDICAÇÕES

1. Inibidores enzimáticos caracterizados por:

a) possuirem uma estrutura quelante heterocíclica do tipo 1-hidroxipiperazino-2,6-diona (Fórmula I), contendo um grupo R_1 ligado ao átomo de azoto em posição 4 do anel e outros substituintes R_α e R_α', nas posições 3 e 5 do anel, enquanto inibidores de metaloenzimas de zinco



I

b) as metaloenzimas em questão fazerem parte da família de endopeptidases designadas por Metaloproteinases de Matriz (MMPs), que estão envolvidas em diversas patologias degenerativas, entre as quais o cancro;

c) o grupo R_1 ter propriedades lipófilas e pode ser seleccionado de um conjunto que inclui grupos alquilo, aril-sulfonilo ou alquil-arilo;

d) o anel piperazínico poder ser substituído na posição α (posição 3 do anel) em relação a um dos carbonilos (R_α) ou nas duas posições α (posições 3 e 5 do anel);

e) o grupo R_α ser um substituinte lipófilo que pode ser seleccionado de um conjunto de grupos alquilo, lineares ou ramificados, ou alquil-carbamatos, nomeadamente contendo anéis aromáticos;

f) o grupo R_α' ser um substituinte lipófilo que pode ser seleccionado de um vasto conjunto de grupos, incluindo grupos alquilo, alquilarilo ou alquil-aril-sulfonamidas, entre outros.

2. Compostos de acordo com a reivindicação anterior, caracterizados por um dos átomos de carbono do grupo ciclo-alquilo ou do anel aromático de R_1 poder ser substituído por um heteroátomo e em que um ou mais dos átomos de hidrogénio do anel aromático pode ainda ser substituído por outro grupo independente, seleccionado de um conjunto que inclui um grupo nitro, metóxido, ou um átomo de halogénio.

3. Compostos de acordo com a reivindicação 2, caracterizados por um dos átomos de hidrogénio do grupo ciclo-alquilo ou do anel aromático de R_1 poder ser substituído por um segundo anel aromático ou um arilóxido.

4. Compostos de acordo com a reivindicação 3, caracterizados por o grupo R_{α}' conter uma função sulfonamida do tipo alquil-benzenosulfonamida(R-$PhSO_2NH_2$, R = cadeia alquílica), que confere ao composto a capacidade de actuar como inibidor eficiente de Anidrases Carbónicas (CAs), metaloenzimas também envolvidas em certos processos do desenvolvimento e progressão de tumores.

5. Aplicação dos compostos reivindicados anteriormente, caracterizada por serem utilizados como inibidores contra MMPs e CAs, inibidores de duplo alvo.

6. Utilização dos compostos reivindicados de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pela produção de medicamentos para terapia contra o cancro.

Lisboa, 27 de Novembro de 2008.

DESCRIÇÃO

"INIBIDORES DE METALO-ENZIMAS COM POTENCIAL APLICAÇÃO CLÍNICA: DERIVADOS 1-HIDROXIPIPERAZINO-2,6-DIONA COMO UM NOVO GRUPO DE LIGAÇAO AO ZINCO"

CAMPO DO INVENTO

Química orgânica e bioorgânica.
O presente invento está relacionado com novos inibidores de MMPs de estrutura cíclica, do tipo 1-hidroxiperazino-2,6-diona que possui uma função do tipo hidroxamato endocíclica e confere capacidade para se ligarem ao zinco do centro activo de algumas proteinases, com selectividade para a inibição de algumas enzimas alvo.

ANTECEDENTES DO INVENTO

Nos últimos anos, têm sido identificadas certas enzimas, nomeadamente metalo-enzimas, como sendo a causa de diversas patologias conhecidas, principalmente devido à sua actividade descontrolada no organismo. Essas metalo-enzimas contêm no principal centro activo um ião metálico (*e.g.* Zn(II), Ni(II), Cu(II)), que está rodeado por diversas cadeias peptídicas, conforme a enzima em questão.

Dentro da inibição de metalo-enzimas, as metalo-proteinases de tecidos matriciais (MMPs) têm sido alvos amplamente estudados, nomeadamente na investigação de agentes terapêuticos contra o cancro [Whittaker, M. *et al.*, *Chemical Reviews* **1999**, 99, 2735-2776; Overall, C. M.; Kleifeld, O. *British Journal of Cancer* **2006**, *94*, 941-

946]. As MMPs são uma família de endopeptidases cuja função no organismo está ligada à degradação de componentes da matriz extracelular, e que têm no seu centro activo um ião de zinco(II). No cofactor enzimático este ião metálico está ligado ao resto da proteína através de três resíduos histidina da cadeia proteica e ainda a uma molécula de água, como quarto ligando, que actua como nucleófilo durante a reacção catalítica. As MMPs ocorrem naturalmente nos organismos, desempenhando funções importantes, tais como na remodelação de tecidos nos casos da reconstrução de órgãos, no crescimento embrionário ou na cura de feridas. No entanto, quando os reguladores e inibidores naturais não actuam eficientemente, podem surgir danos graves nos tecidos, dando origem a diversos tipos de doenças, como é o caso da artrite (erosão da cartilagem das articulações afectadas), reumatismo, doenças periodontais, ulceração da córnea, etc. [Hanessian, S. *et al.* *Tetrahedron* **2001**, 57, 6885-6900; Hu, Y. *et al.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 6629-6644] A mediação das MMPs no desenvolvimento de tumores malignos está também comprovada, as quais podem intervir na destruição do tecido circundante para possibilitar o crescimento destes, na penetração dos vasos sanguíneos dentro do próprio tumor (angiogénese), ou ainda outras funções de sinalização que contribuem para o carácter invasivo do tumor e para a formação de metástases.[Egeblad, M.; Werb, Z. *Nature Reviews Cancer* **2002**, *2*, 161-174]

Assim, com o objectivo de encontrar novos fármacos eficazes no tratamento de algumas das doenças referidas acima, muitos estudos têm sido efectuados no sentido de desenvolver compostos capazes de inibir a actividade descontrolada das respectivas metalo-enzimas. Em todos eles, a inibição está relacionada com a ligação da

molécula do inibidor ao ião metálico (ZBG, *zinc-binding group*) do centro activo da enzima. Por isso todos os inibidores deste tipo de enzimas devem conter um grupo funcional capaz de coordenar o ião metálico, devendo este grupo quelante estar inserido numa estrutura molecular que assegure uma boa interacção com as diversas partes da enzima que rodeiam aquele centro metálico.

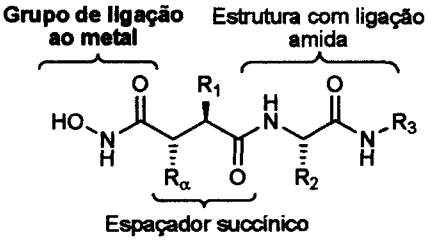
Como grupos de coordenação ao metal (ZBG), no caso particular das MMPs, têm sido testados ácidos carboxílicos, ácidos hidroxâmicos, tióis, compostos de fósforo, sulfo-di-imidas, etc. [Beckett, R. P. *et al.* *Drug Discovery Today* **1996**, *1*, 16-26]. Contudo, geralmente são os compostos contendo grupos hidroxâmicos (com a função -CONHOH) os inibidores mais potentes, pelo que esta foi classe de inibidores de MMPs mais estudada até hoje. Existem inúmeras variantes estruturais que foram sintetizadas e testadas como inibidores de MMPs e outros tipos de metalo-enzimas, tendo muitas delas demonstrado potencialidade para serem usadas como drogas para o tratamento das várias patologias mencionadas. Contudo, os resultados dos testes clínicos têm sido desencorajadores, pois até à data nenhum destes inibidores passou à última fase, devido à ausência de benefícios da sua aplicação em doentes com cancro em fases avançadas, ou devido ao surgimento de efeitos secundários que tenham limitado demasiado a sua dosagem e consequente eficácia. Estudos recentes permitiram concluir que, para uma terapia viável e eficaz tendo como objectivo a inibição de MMPs, é necessário que os inibidores tenham selectividade por determinadas enzimas-alvo, previamente identificadas e validadas, evitando a inibição das MMPs com funções importantes para organismo (MMPs anti-alvo). [Overall, C. M.; Kleifeld, O. *Nature Reviews Cancer* **2006**, *6*, 227-239]

Este invento traz a hipótese de desenvolver novos inibidores potentes e selectivos contra essas MMPs alvo, nomeadamente com aplicação no combate do cancro.

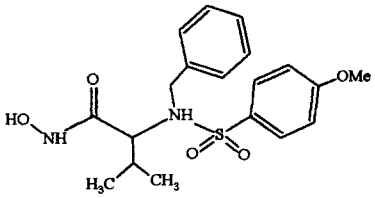
DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Neste invento, e de acordo com o que foi referido atrás sobre os principais grupos de inibidores de metalo-enzimas, os autores propõem como novos inibidores alguns compostos heterocíclicos contendo a função hidroxamato como grupo de coordenação ao ião catalítico no centro activo da enzima.

Na exploração de inibidores sintéticos de metalo-enzimas, os primeiros compostos que se desenvolveram eram sobretudo compostos derivados de peptídeos (ver Fórmula I), mas foram descobertos mais recentemente compostos não peptídeos apresentando também boas propriedades inibitórias (ver Fórmula II).



Fórmula I



Fórmula II

Os requisitos estruturais mais importantes num inibidor de MMPs são: um grupo de coordenação ao zinco, capaz de quelatar o centro activo de zinco(II); pelo menos um grupo que possa interactuar com o esqueleto enzimático por ligações de hidrogénio; uma ou mais cadeias laterais

hidrófobas, para interacções de van der Waals com outras zonas da enzima [Beckett, R. P. *et al.* *Drug Discovery Today* **1996**, *1*, 16-26].

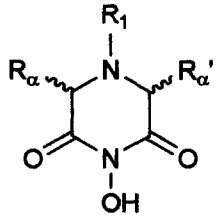
Um grande número de derivados hidroxamato tem sido estudado, quer pela exploração do tipo de esqueleto de suporte quer pela introdução de uma grande variedade de substituintes, de forma a aumentar a selectividade por algumas enzimas relativamente a outras, para além de se tentar melhorar a biodisponibilidade oral.

A exploração dos resíduos hidrófobos R_1 (Fórmula I), que interactuam com a zona de selectividade S_1' da enzima, tem sido nos últimos anos um alvo principal no *design* de inibidores selectivos de MMPs e de outras metalo-enzimas. O efeito dos resíduos R_2 e R_3 tem sido menos explorado, uma vez que a sua contribuição tem um efeito menor na selectividade e eficiência da interacção com a enzima. O resíduo R_α poderá ter um efeito positivo na actividade inibitória mas, no geral, a sua principal característica é de melhorar a biodisponibilidade oral dos compostos. [Beckett, R. P. *et al.* *Drug Discovery Today* **1996**, *1*, 16-26; Borkakoti, N. *Journal of Molecular Medicine* **2000**, *78*, 261-268]

Muitas evidências têm surgido indicando que a inibição de certas MMPs poderá originar efeitos secundários nefastos, nomeadamente o surgimento de *desordens musculo-esqueléticas* (com a inibição da MMP-1) ou o aumento das características proliferativas dos tumores com a inibição da MMP-8, numa terapia de tratamento do cancro.[Dahlberg, L. *et al.* *Arthritis & Rheumatism* **2000**, *43*, 673-682; Overall, C. M.; Kleifeld, O. *Nature Reviews Cancer* **2006**, *6*, 227-239] Desta forma, recentemente têm-se desenvolvido esforços no sentido de sintetizar inibidores de metalo-enzimas não apenas com elevada capacidade inibitória, mas

também com perfis de selectividade adequados à terapia a que se destinam.

A descoberta dos inibidores constituintes deste invento vem no seguimento da patente **PT 103003,** na qual foram apresentados inibidores do tipo hidroxâmico com elevadas actividades na inibição de MMPs; estes compostos foram preparados por derivatização do anidrido succínico ou do ácido iminodiacético, sendo de simples preparação e possuindo os resíduos moleculares básidos considerados essenciais para a interacção favorável com as enzimas. Os inibidores incluídos neste invento possuem a estrutura geral representada na Fórmula III.



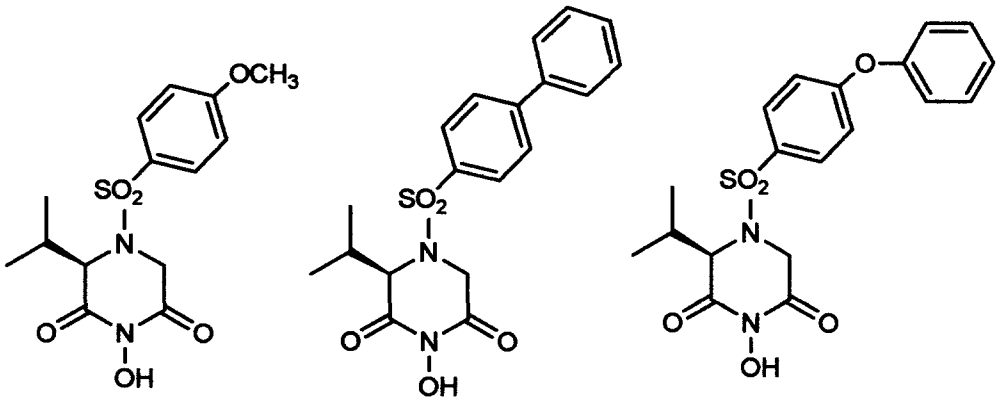
Fórmula III

Na Fórmula III, o grupo hidroxilo ligado ao átomo de azoto na posição 1 do anel piperazio-2,6-diona, juntamente com um dos dos grupos carbonilo adjacentes, formam o grupo bidentado do tipo hidroxamato cíclico, que irá coordenar o ião catalítico zinco(II) das enzimas. O facto destes compostos apresentarem esta estrutura cíclica confere maior estabilidade contra a hidrólise, relativamente aos hidroxamatos acíclicos primários descritos na literatura, constituindo assim o principal factor inovador associado a esta descoberta, ou seja, é aqui apresentado um novo grupo quelante de ligação ao zinco catalitico. O grupo R_1 é um grupo lipófilo, contendo anéis aromáticos ou alifáticos, de forma a providenciar interacções favoráveis de van der Waals com

as partes hidrófobas do domínio catalítico da enzima, nomeadamente com a cavidade S_1'. Os grupos R_α e R_α' da Fórmula III poderão corresponder a H ou a grupos preferencialmente hidrófobos, incluindo ou não átomo com a capacidade para estabelecer pontes de hidrogénio com alguns resíduos peptídicos da enzima. Supõe-se que um desses grupos R_α irá interactuar com a zona hidrófoba S_1, podendo aumentar a actividade de inibição e a biodisponibilidade oral dos compostos por redução da sua metabolização *in vivo*. Possivelmente, existindo um substituinte R_α' $_\alpha$ H, este irá interactuar com o subsítio S_2' da enzima, podendo dessa forma aumentar a actividade inibitória dos compostos. São, então, preferíveis grupos R_α' hidrófobos contendo átomos que possibilitem a formação de pontes de hidrogénio com a enzima, nomeadamente grupos do tipo alquil-aril-sulfonamida (R-$PhSO_2NH_2$, sendo R uma cadeia alquílica). Para um substituinte R_α' contendo uma função sulfonamida primária, existe a possibilidade de o composto possuir a capacidade de inibir eficientemente outras metaloenzimas de zinco, tais como as anidrases carbónicas (CAs), podendo neste caso tratar-se de inibidor de duplo-alvo (capaz de inibir MMPs e CAs), com potencialidades acrescidas no seu uso terapêutico (nomeadamente contra o cancro). [Santos, M. A. *et al.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 1538-1543]

Assim, para o composto que foi apresentado como Exemplo na patente **PT 103003**, não existe qualquer substituinte R_α e temos o grupo benzilo como *N*-substituinte (i.e. $R_\alpha = R_\alpha' = H$, $R_1 = Bn$). Para os compostos apresentados nos Exemplos 1-3 desta patente, temos R_α = (R)-isopropilo, $R_\alpha' = H$, $R_1 = -SO_2-Ar$, com Ar = $-PhOCH_3$ (**1**), -PhPh (**2**), -PhOPh (**3**) (ver Fórmula III).

A síntese destes compostos pode envolver estratégias de complexidades diferentes, dependendo dos grupos R_α pretendidos e da disponibilidade comercial dos materiais de partida. Assim, por exemplo, o composto da patente **PT 103003** (R_α = R_α' = H, R_1 = benzilo) foi sintetizado a partir do ácido *N*-benzil-iminodiacético (BIDA) num único passo reaccional. Por outro lado, as sínteses dos compostos **1-3** necessitaram de uma sequência de vários passos para obter o produto final, partindo do aminoácido opticamente activo, a D-valina. Este procedimento sintético envolveu uma sucessão de acoplamentos, através de substituições nucleófilas e remoção de grupos protectores, em que a ciclização do ácido hidroxâmico foi efectuada mediante a activação prévia do grupo carboxílico (ácido *N*-acético) com etilcloroformato, dando-se a substituição no respectivo carbonilo através do ataque nucleófilo intramolecular por parte do átomo de azoto do ácido hidroxâmico do seu precursor (Esquema 1).



1 **2** **3**

Propriedade dos Novos Inibidores Enzimáticos

Os novos inibidores enzimático incluídos neste invento são todos sólidos brancos ou pálidos, alguns dos quais muito higroscópicos que não permitiram determinar o ponto de fusão. Todos foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (^{1}H-RMN), espectrometria de massa, tendo os compostos finais sido ainda caracterizados por análise elementar de *C*, *H* e *N* e, num dos casos, por ^{13}C-RMN.

Os compostos aqui apresentados como exemplos foram estudados em termos da sua actividade inibitória perante duas MMPs (MMP-1 e -2) e num dos casos (composto **3**) também por mais duas (MMP-8, -14), sendo os resultados apresentados no Exemplo 4. Através destes estudos, verificamos que alguns dos novos compostos preparados (**2** e **3**) apresentam actividade inibitória na gama nanomolar por diversas MMPs, apresentando também selectividade pela MMP-2 *versus* MMP-1. Este perfil de selectividades é desejável numa possível aplicação contra o cancro, devido às desordens musculo-esqueléticas que a inibição da MMP-1 provoca. A actividade e selectividade são mais elevados no composto **3** do que nos restantes, o que se explica pelo facto de que um grupo R_1 mais volumoso, interactuando provavelmente com o subsítio S_1' destas enzimas, irá aumentar a selectividade pelas MMPs com cavidades S_1' profundas (como é o caso da MMP-2) relativamente às enzimas que possuem esse subsítio menos profundo (que é o caso da MMP-1). Assim sendo, espera-se que introduzindo grupos R_1 ainda mais longos e volumosos possa, eventualmente, resultar numa selectividade mais elevada pela MMP-2.

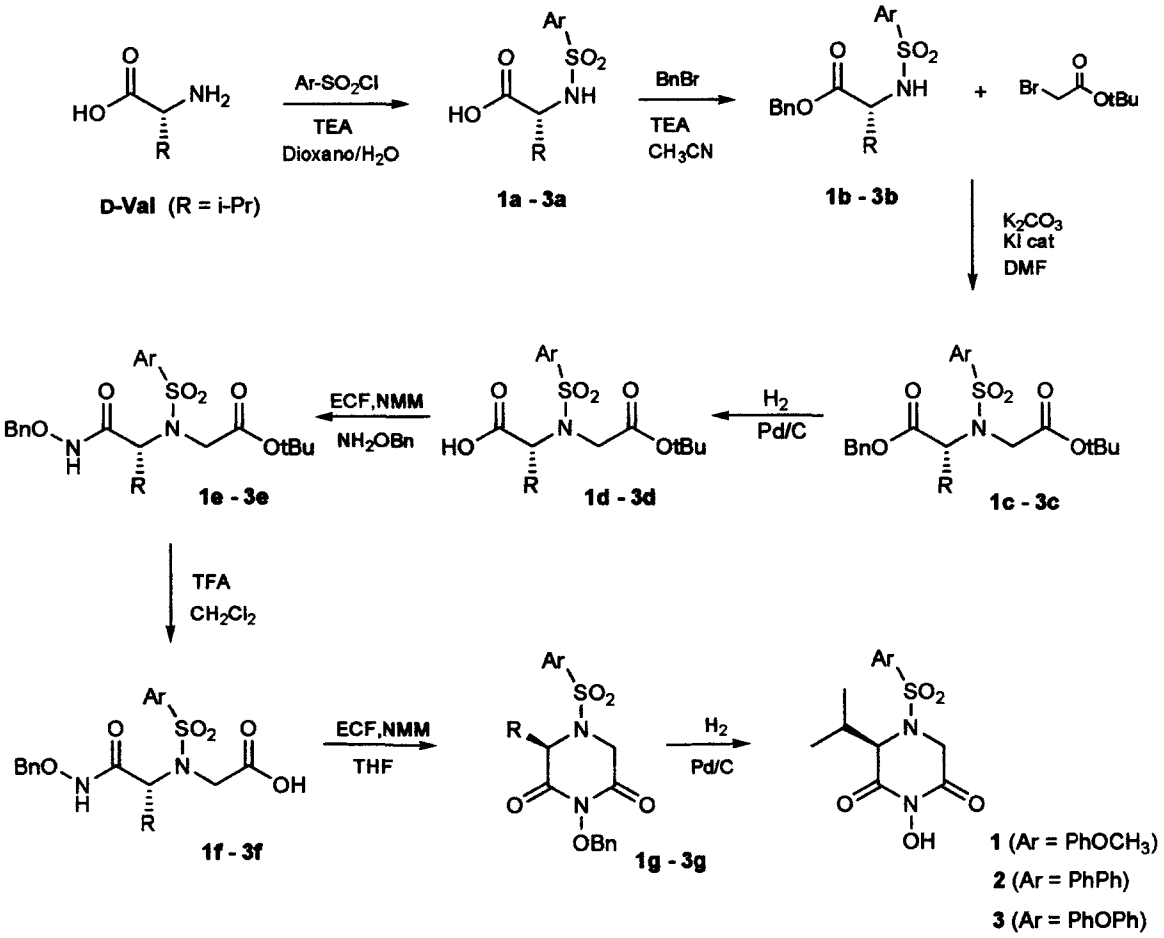
Por outro lado, sabe-se que grupos R_α hidrófobos podem aumentar a actividade dos inibidores, aumentando ou não a selectividade, [Yoshiizumi, K. *et al.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, *11*, 433-450; Rossello, A. *et al.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 1321-1326] de forma que variando a natureza deste grupo poder-se-á alterar a actividade dos compostos e, eventualmente, o perfil de selectividade dos novos inibidores. Assim, se em vez do grupo (*R*)-isopropilo usado nos presentes exemplos, forem inseridos outros grupos mais volumosos, nomeadamente do tipo alquilcarbamatos aromáticos, os perfis de actividade e selectividade poderão ser optimizados.

Em conclusão, neste invento é apresentada uma nova classe de compostos contendo um grupo 1-hidroxipiperazino-2,6-diona, do tipo ácido hidroxâmico cíclico, possuindo elevada actividade como inibidores de metaloproteinases, nomeadamente MMPs, com potencial aplicação clínica. Variando os diferentes grupos substituintes daquele anel é possível modelar o perfil de actividades e selectividades pelas diferentes MMPs. Acrescentando num dos substituintes, R_α', uma função extra do tipo arilsulfonamida ($ArSO_2NH_2$) será possível introduzir no composto a capacidade de inibir também outras metaloenzimas, tais como Anidrases Carbónicas, tornando-se o composto num possível inibidor de duplo alvo com elevada potencialidade terapêutica.

EXEMPLOS

Síntese dos compostos:

A síntese completa dos compostos **1-3**, descrita nos Exemplos 1-3, é apresentada de forma resumida no Esquema 1.



Esquema 1

EXEMPLO 1

Síntese de 4-(4-metoxibenzenosulfonil)-(*R*)-3-isopropil-1-hidroxi-piperazino-2,6-diona (1)

N-*(4-metoxibenzenosulfonil)-D-valina (1a)*
Uma solução de D-valina (0.50 g, 4.27 mmol), cloreto de 4-metoxibenzenosulfonilo (0.97 g, 4.70 mmol) e TEA (0.89 mL, 6.40 mmol) em água/dioxano 1:1 (100 mL) foi agitada durante 12 h. A mistura foi evaporada, o resíduo foi dissolvido em NaOH 5% (50 mL) e lavado com CH_2Cl_2 (4×50 mL); o pH da fase aquosa foi baixado a 1-2 com HCl conc. e esta foi extraída com CH_2Cl_2 (3×50 mL). Após secagem da fase orgânica sobre Na_2SO_4 anidro e evaporação do solvente, o produto puro foi obtido como um sólido branco (0.75 g, rendimento 61%). P.f. 93-95 °C; ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.77 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar***H***), 6.95 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar***H***), 5.06 (d, J = 9.6 Hz, 1H, N***H***), 3.86 (s, 3H, OC***H***$_3$), 3.80-3.75 (2d, 1H, NC***H***(iPr)), 2.15-2.05 (m, 1H, C***H***$(CH_3)_2$), 0.97 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.87 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 288 $(M+H)^+$, 310 $(M+Na)^+$.

N-*(4-metoxibenzenosulfonil)-O-benzil-D-valina (1b)*
Uma solução de **1a** (0.748 g, 2.60 mmol), brometo de benzilo (0.34 mL, 2.86 mmol) e TEA (0.54 mL, 3.90 mmol) em acetonitrilo (30 mL) foi agitada sob refluxo durante 12 h. O solvente foi evaporado, o resíduo foi dissolvido em acetato de etilo (30 mL) e de seguida extraído com HCl 0.1 M (3×30 mL); depois de se ter adicionado à fase orgânica n-hexano (10 mL), a mistura foi lavada com 5% NaOH (3×40 mL), a fase orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 anidro e após evaporação do solvente, o produto puro foi obtido como um sólido branco (0.79 g, rendimento 80%).

P.f. 82-83 °C; ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.74 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar***H***), 7.35-7.33 (m, 3H, Ph***H***), 7.19-7.18 (m, 2H, Ph***H***), 6.89 (d, J = 9.3 Hz, 2H, Ar***H***), 5.06 (d, J = 9.6 Hz, 1H, N***H***), 4.88 (s, 2H, C***H***$_2$Ph), 3.84 (s, 3H, OC***H***$_3$), 3.78-3.73 (2d, 1H, NC***H***(iPr)), 2.10-2.00 (m, 1H, C***H***$(CH_3)_2$), 0.95 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.84 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 378 $(M+H)^+$, 400 $(M+Na)^+$.

N-*(4-metoxibenzenosulfonil)*-N-*terc-butoxicarbonilmetil*-O-*benzil-D-valina (1c)*

A uma suspensão de **1b** (0.780 g, 2.07 mmol), K_2CO_3 (2.86 g, 20.7 mmol) e KI (0.069 g, 0.41 mmol) em DMF seca (20 mL) adicionou-se bromoacetato de *terc*-butilo (0.61 mL, 4.14 mmol) e a mistura ficou a agitar à T_{amb} durante 3 dias. À mistura reaccional adicionou-se n-hexano/acetato de etilo 1:1 (40 mL) e realizaram-se extracções com água (2×40 mL), NaOH 5% (40 mL) e por fim uma solução saturada de NaCl (40 mL). Após secagem da fase orgânica sobre Na_2SO_4 anidro e evaporação do solvente, o resíduo foi dissolvido em metanol (25 mL) e a solução foi refluxada com carvão activado (0.5 g) durante 3 h; após filtração e evaporação do solvente obteve-se um óleo amarelo (1.02 g). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.82 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar***H***), 7.37-7.34 (m, 3H, Ph***H***), 7.26-7.24 (m, 2H, Ph***H***), 6.83 (d, J = 8.7, 2H, Ar***H***), 4.97, 4.83 (dd, J = 12.3 Hz, 2H, C***H***$_2$Ph), 4.23, 3.92 (dd, J = 18.0, 18.6 Hz, 2H, C***H***$_2$CO$_2$tBu), 3.97 (d, J = 11.4, 1H, NC***H***(iPr)), 3.82 (s, 3H, OC***H***$_3$), 2.06-1.98 (m, 1H, C***H***$(CH_3)_2$), 1.45 (s, 9H, tBu***H***), 0.99(d, J = 6.6 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.85 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 436 $(M-tBu+2H)^+$, 458 $(M-tBu+H+Na)^+$, 514 $(M+Na)^+$.

N-(4-metoxibenzenosulfonil)-N-terc-butoxicarbonilmetil-D-valina (1d)

Seguiu-se o **método geral para hidrogenação catalítica**: a uma solução de **1c** (0.200 g, 0.41 mmol) em metanol (10 mL) foi adicionado Pd/C 10% (0.050 g). A suspensão foi agitada à T_{amb} sob atmosfera de H_2 (4 bar) durante 4 h Após filtração e evaporação do solvente, o resíduo foi dissolvido em NaOH 2 M (50 mL) e lavado com n-hexano (2×50 mL); a fase aquosa foi então extraída com acetato de etilo (3×50 mL) e a fase orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 anidro e o solvente evaporado, obtendo-se o produto puro como uma espuma branca higroscópica (0.87 g, rendimento global **1c-1d**: 98%). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.86 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar***H***), 6.96 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar***H***), 4.12, 3.97 (dd, J = 18.3 Hz, 2H, C***H***$_2$CO$_2$tBu), 3.87 (s, 3H, OC***H***$_3$), 3.81 (d, J = 9.9 Hz, 1H, NC***H***(iPr)), 2.07-1.98 (m, 1H, C***H***(CH$_3$)$_2$), 1.45 (s, 9H, tBu***H***), 0.96 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.89 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 368 $(M-tBu+H+Na)^+$, 424 $(M+Na)^+$, 346 $(M-tBu+2H)^+$.

Ácido N-(4-metoxibenzenosulfonil)-N-terc-butoxicarbonilmetil-O-benzil-D-valino-hidroxâmico (1e)

A uma solução de **1d** (0.827 g, 2.06 mmol) em THF seco (25 mL), arrefecida sobre gelo, foi adicionado ECF (0.23 mL, 2.37 mmol) e NMM (0.26 mL, 2.37 mmol) e a mistura foi agitada a 0 °C durante 45 min. Entretanto, uma solução de hidrocloreto de *O*-benzil-hidroxiamina (0.411 g, 2.58 mmol) em metanol seco foi neutralizada com KOH (0.144 g, 2.58 mmol), por agitação a 0 °C durante 30 min seguida de filtração. O ácido carboxílico activado foi então adicionado lentamente sobre a hidroxilamina, deixando reagir a 0 °C durante 4 h sob atmosfera de azoto. A mistura foi evaporada e o resíduo dissolvido em éter

etílico (30 mL), o qual foi depois extraído com uma solução aquosa de HCl 1 M (2×30 mL); à fase orgânica foi adicionado éter de petróleo (30 mL) e a mistura resultante foi extraída com NaOH 5% (3×50 mL). O produto puro foi obtido como um sólido branco higroscópico, após secagem da fase orgânica final sobre Na_2SO_4 anidro e evaporação do solvente (0.71 g, rendimento 68%). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 8.99 (s, 1H, CON***H***OBn), 7.83 (d, J = 9.3 Hz, 2H, Ar***H***), 7.44-7.36 (m, 5H, Ph***H***), 6.96 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar***H***), 4.93 (s, 2H, C***H***$_2$Ph), 4.13, 3.89 (dd, J = 17.7, 16.5 Hz, 2H, C***H***$_2$CO$_2$tBu), 3.86 (s, 3H, OC***H***$_3$), 3.28 (d, J = 10.5 Hz, 1H, NC***H***(iPr)), 2.12-2.04 (m, 1H, C***H***(CH$_3$)$_2$), 1.48 (s, 9H, tBu***H***), 0.78 (d, J = 6.0 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.43 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 451 $(M-tBu+2H)^+$, 529 $(M+Na)^+$, 507 $(M+H)^+$.

Ácido N-(4-metoxibenzenosulfonil)-N-hidroxicarbonilmetil-O-benzil-D-valino-hidroxâmico (1f)

A uma solução de **1e** (0.708 g, 1.40 mmol) em diclorometano (5 mL) foi adicionado TFA (3.3 mL) e a mistura resultante foi agitada à T_{amb} durante 2 h. A solução foi evaporada, o resíduo foi dissolvido em NaOH 5% (40 mL) e foi lavado com éter etílico (2×40 mL); o pH da fase aquosa foi reduzido a *ca* 6 com uma solução aquosa de HCl 2 M e esta foi extraída com CH_2Cl_2 (3×20 mL). Após secagem da fase orgânica sobre Na_2SO_4 e evaporação do solvente, o produto puro foi obtido como um sólido branco (0.46 g, rendimento 73%). P.f. 83-86 °C; ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 8.92 (s, 1H, CON***H***OBn), 7.79 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar***H***), 7.42-7.36 (m, 5H, Ph***H***), 6.95 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar***H***), 4.88 (s, 2H, C***H***$_2$Ph), 4.28, 3.99 (dd, J = 18.3, 18.6 Hz, 2H, C***H***$_2$CO$_2$H), 3.85 (s, 3H, OC***H***$_3$), 3.36 (d, J = 10.5 Hz, 1H, NC***H***(iPr)), 2.13-2.05 (m, 1H, C***H***(CH$_3$)$_2$), 0.76 (d, J = 6.0 Hz, 3H,

CHCH_3), 0.42 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CHCH_3); m/z (FAB): 473 $(M+Na)^+$, 451 $(M+H)^+$.

4-(4-Metoxibenzenosulfonil)-(R)-3-isopropil-1-benziloxi-piperazino-2,6-diona (1g)

A uma solução de **1f** (0.200 g, 0.44 mmol) em THF seco (30 mL) a 0 °C foi adicionado ECF (0.050 mL, 0.53 mmol) e NMM (0.058 mL, 0.53 mmol), a mistura foi agitada durante 1 h e depois o solvente foi evaporado. O resíduo foi dissolvido em éter etílico/acetato de etilo 1:1 (40 mL) e a solução foi lavada com HCl 0.1 M (2×40 mL), NaOH 5% (2×40 mL) e por fim água (40 mL). Após secagem sobre Na_2SO_4 anidro e evaporação do solvente, o produto puro foi obtido como um sólido branco (0.112 g, rendimento 59%). P.f. 75-76 °C; ^{1}H-RMN ($CDCl_3$) δ (ppm) 7.74 (d, J = 8.7 Hz, 2H, ArH), 7.35 (s, 5H, PhH), 7.00 (d, J = 8.4 Hz, 2H, ArH), 4.73, 4.05 (dd, J = 19.8, 19.5 Hz, 2H, NCH_2CON), 4.39, 4.32 (dd, J = 9.0 Hz, 2H, CH_2Ph), 4.22 (d, J = 10.2 Hz, 1H, NCH(iPr)CON), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 1.99-1.90 (m, 1H, CH(CH_3)$_2$), 1.10 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CHCH_3), 1.03 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CHCH_3); m/z (FAB): 433 $(M+H)^+$, 455 $(M+Na)^+$.

4-(4-Metoxibenzenosulfonil)-(R)-3-isopropil-1-hidroxi-piperazino-2,6-diona (1)

Procedeu-se à hidrogenação catalítica de **1g** para remover o grupo benzilo, tal como descrito na síntese de **1d** mas usando uma pressão de H_2 de 1.5 bar. Após recristalização do resíduo com éter etílico/éter de petróleo, o produto puro foi obtido como um sólido branco higroscópico (rendimento 96%). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.68 (d, J = 8.7 Hz, 2H, ArH), 6.98 (d, J = 8.7 Hz, 2H, ArH), 4.75, 4.11 (dd, J = 19.5 Hz, 2H, NCH_2CON), 4.27 (d, J = 9.9 Hz, 1H, NCH(iPr)CON), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 2.13-2.02 (m, 1H,

C***H***$(CH_3)_2$), 1.15-1.10 (2d, 6H, CH(C***H***$_3)_2$); m/z (FAB): 343 $(M+H)^+$, 365 $(M+Na)^+$. Análise Elem.: calc. ($C_{14}H_{18}N_2O_6S \cdot 0.3H_2O$): C, 48.39; H, 5.39; N, 8.06; S, 9.23%.; enc.: C, 48.47; H, 5.29; N, 7.79; S, 8.96%.

EXEMPLO 2

Síntese de 4-(4-bifenilsulfonil)-(*R*)-3-isopropil-1-hidroxi-piperazino-2,6-diona (2)

N-*(4-bifenilsulfonil)-D-valina (2a)*

Um procedimento idêntico ao usado na síntese de **1a** foi seguido com a D-valina e o cloreto de 4-bifenilsulfonilo em vez do cloreto de 4-metoxibenzenosulfonilo. O produto puro foi obtido como um sólido branco (rendimento 40%). P.f. 156-158 °C; ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.87 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar***H***), 7.68 (d, J = 10.2 Hz, 2H, Ar***H***), 7.60 (d, J = 6.9 Hz, 2H, Ar***H***), 7.49-7.43 (m, 3H, Ar***H***), 5.05 (d, J = 9.9 Hz, 1H, N***H***), 3.86-3.81 (2d, 1H, NC***H***(iPr)), 2.16-2.05 (m, 1H, C***H***$(CH_3)_2$), 0.98 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.86 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 356 $(M+Na)^+$, 334 $(M+H)^+$.

N-*(4-bifenilsulfonil)-O-benzil-D-valina (2b)*

Seguiu-se um procedimento semelhante ao usado na síntese de **1b**, partindo do **2a**. Obteve-se um sólido branco como sendo o produto puro (rendimento 70%). P.f. 99-101 °C; ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.86 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar***H***), 7.64 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar***H***), 7.58 (d, J = 7.8 Hz, 2H, Ar***H***), 7.51-7.43 (m, 3H, Ar***H***), 7.26-7.24 (m, 3H, Ar***H***), 7.14-7.12 (m, 2H, Ar***H***), 5.14 (d, J = 10.5 Hz, 1H, N***H***), 4.84 (s, 2H, C***H***$_2$Ph), 3.86-3.81 (2d, 1H, NC***H***(iPr)), 2.14-2.05 (m, 1H, C***H***$(CH_3)_2$), 0.97 (d, J = 7.5 Hz, 3H, CHC***H***$_3$),

0.85 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 424 $(M+H)^+$, 446 $(M+Na)^+$.

N-*(4-bifenilsulfonil)*-N-*terc-butoxicarbonilmetil*-O-*benzil-D-valina (2c)* e
N-*(4-bifenilsulfonil)*-N-*terc-butoxicarbonilmetil-D-valina (2d)*

Seguiu-se um procedimento semelhante ao descrito para as sínteses dos compostos **1c-1d**, mas usando aqui o **2b** como material de partida. O produto final (**2d**) puro foi obtido como um sólido branco (rendimento global 84%).

N-*(4-bifenilsulfonil)*-N-*terc-butoxicarbonilmetil*-O-*benzil-D-valina (2c):*

^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.93 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar***H***), 7.59-7.56 (2d, 4H, Ar***H***), 7.51-7.41 (m, 3H, Ar***H***), 7.26-7.23 (m, 5H, Ar***H***), 4.96, 4.79 (dd, J = 12.3, Hz, 2H, C***H***$_2$Ph), 4.28, 3.95 (dd, J = 18.3 Hz, 2H, C***H***$_2$CO$_2$tBu), 4.07 (d, J = 10.2, 1H, NC***H***(iPr)), 2.16-2.02 (m, 1H, C***H***$(CH_3)_2$), 1.45 (s, 9H, tBu***H***), 1.03 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.77 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 482 $(M-tBu+2H)^+$, 504 $(M-tBu+H+Na)^+$, 560 $(M+Na)^+$, 538 $(M+H)^+$.

N-*(4-bifenilsulfonil)*-N-*terc-butoxicarbonilmetil-D-valina (2d):*

P.f. 113-115 °C; ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 8.17 (d, J = 8.1 Hz, 2H, Ar***H***), 7.48-7.33 (m, 7H, Ar***H***), 4.34, 4.18 (dd, J = 18.3 Hz, 2H, C***H***$_2$CO$_2$tBu), 4.75 (d, J = 10.2 Hz, 1H, NC***H***(iPr)), 2.01-1.87 (m, 1H, C***H***$(CH_3)_2$), 1.45 (s, 9H, tBu***H***), 0.91 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.29 (d, J = 5.7 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 436 $(M-tBu+2Na)^+$, 414 $(M-tBu+H+Na)^+$, 392 $(M-tBu+2H)^+$, 470 $(M+Na)^+$.

Ácido N-*(4-bifenilsulfonil)*-N-*terc-butoxicarbonilmetil*-O-*benzil-D-valino-hidroxâmico (2e)*

Foi seguido um procedimento idêntico ao usado na preparação do **1e**, partindo de **2d**, tendo-se obtido o produto puro como um sólido higroscópico amarelo (rendimento 80%). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 8.96 (s, 1H, CON***H***OBn), 7.95 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar***H***), 7.72 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar***H***), 7.61 (d, J = 6.9 Hz, 2H, Ar***H***), 7.51-7.36 (m, 8H, Ar***H***), 4.94 (s, 2H, C***H***$_2$Ph), 4.19, 3.93 (dd, J = 18.6, 18.3 Hz, 2H, C***H***$_2$CO$_2$tBu), 3.36 (d, J = 11.7, 1H, NC***H***(iPr)), 2.20-2.09 (m, 1H, C***H***(CH$_3$)$_2$), 1.45 (s, 9H, tBu***H***), 0.79 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.44 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 497 $(M-tBu+2H)^+$, 553 $(M+H)^+$, 575 $(M+Na)^+$.

Ácido N-*(4-bifenilsulfonil)*-N-*hidroxicarbonilmetil*-O-*benzil-D-valino-hidroxâmico (2f)*

Foi seguido um procedimento idêntico descrito para o composto **1f**, usando aqui como reagente o **2e**. Obteve-se o produto puro como um sólido branco (rendimento 61%). P.f. 109-111 °C; ^{1}H-NMR (CD_3OD), δ (ppm): 7.98 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar***H***), 7.80 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar***H***), 7.65 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar***H***), 7.48-7.28 (m, 8H, Ar***H***), 4.73 (s, 2H, C***H***$_2$Ph), 4.18, 3.86 (dd, J = 18.3, 17.7 Hz, 2H, C***H***$_2$CO$_2$H), 3.68 (d, J = 9.0, 1H, NC***H***(iPr)), 2.09-1.99 (m, 1H, C***H***(CH$_3$)$_2$), 0.86 (d, J = 6.0 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.77 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 519 $(M+Na)^+$.

4-(4-Bifenilsulfonil)-(R)-3-isopropil-1-benziloxi-piperazino-2,6-diona (2g)

Procedeu-se de forma idêntica ao seguido na síntese do composto **1g**, usando aqui o **2f** como material de partida. O produto puro foi obtido como um sólido branco (rendimento

40%). P.f. 130-133 °C; ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.88 (d, J = 8.1 Hz, 2H, Ar***H***), 7.74 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar***H***), 7.46-7.38 (m, 5H, Ar***H***), 7.25 (s, 5H, Ar***H***), 4.79, 4.10 (dd, J = 19.8, 19.5 Hz, 2H, NC***H***$_2$CON), 4.32-4.22 (m, 3H, C***H***$_2$Ph, NC***H***(iPr)CON), 2.6-1.05 (m, 1H, C***H***$(CH_3)_2$), 1.14 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 1.07 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 479 $(M+H)^+$, 501 $(M+Na)^+$.

4-(4-Bifenilsulfonil)-(R)-3-isopropil-1-hidroxi-piperazino-2,6-diona (2)

Seguiu-se o procedimento para hidrogenação catalítica de **2g**, tal como descrito para o composto **1**. Da recristalização final do resíduo com éter etílico/éter de petróleo obteve-se o produto puro como um sólido branco (rendimento 86%). P.f. 164-165 °C; ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.81 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar***H***), 7.74 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar***H***), 7.59 (d, J = 6.6 Hz, 2H, Ar***H***), 7.51-7.43 (m, 3H, Ar***H***), 4.80, 4.15 (dd, J = 19.5 Hz, 2H, NC***H***$_2$CON), 4.34 (d, J = 9.6, 1H, NC***H***(iPr)CON), 2.17-2.03 (m, 1H, C***H***$(CH_3)_2$), 1.18-1.12 (2d, 6H, CH(C***H***$_3$)$_2$); m/z (FAB): 389 $(M+H)^+$, 411 $(M+H)^+$. Análise Elem.: calc. ($C_{19}H_{20}N_2O_5S \cdot 0.3Et_2O$): C, 59.07; H, 5.63; N, 6.83; S, 7.82%; enc.: C, 59.11; H, 5.20; N, 6.87; S, 8.12%.

EXEMPLO 3

4-(4-Fenoxibenzenosulfonil)-(*R*)-3-isopropil-1-hidroxi-piperazino-2,6-diona (3)

N-*(4-fenoxibenzenosulfonil)-D-valina (3a)*

Seguiu-se um procedimento idêntico ao usado para o composto **1a**, partindo da D-valina e do cloreto de 4-fenoxibenzenosulfonilo em vez do cloreto de 4-metoxibenzenosulfonilo. O produto puro foi obtido como um sólido branco após recristalização final de n-hexano

(rendimento 67%). P.f. 97-99 °C; ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.78 (d, J = 9.3 Hz, 2H, Ar***H***), 7.41 (t, J = 8.0 Hz, 2H, Ar***H***), 7.22 (t, J = 7.6 Hz,1H, Ar***H***), 7.06-6.99 (2d, 4H, Ar***H***), 5.07 (d, J = 9.6 Hz, 1H, N***H***), 3.84-3.79 (2d, 1H, NC***H***(iPr)), 2.16-2.09 (m, 1H, C***H***$(CH_3)_2$), 0.99 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.89 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 350 $(M+H)^+$, 372 $(M+Na)^+$.

N-*(4-fenoxibenzenosulfonil)*-O-*benzil-D-valina (3b)*
Foi seguido um procedimento semelhante ao usado na síntese de **1b**, partindo do **3a**, tendo-se obtido o produto puro como um óleo amarelo (rendimento 81%). P.f. 57-59 °C; ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.75 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar***H***), 7.40 (t, J = 8.1 Hz, 2H, Ar***H***), 7.38-7.20 (m, 6H, Ar***H***), 7.03 (d, J = 7.8 Hz, 2H, Ar***H***), 6.96 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar***H***), 5.09 (d, J = 9.6 Hz, 1H, N***H***), 4.92 (s, 2H, C***H***$_2$Ph), 3.81-3.76 (2d, 1H, NC***H***(iPr)), 2.12-2.05 (m, 1H, C***H***$(CH_3)_2$), 0.96 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.84 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 462 $(M+Na)^+$, 440 $(M+H)^+$.

N-*(4-fenoxibenzenosulfonil)*-N-*terc-butoxicarbonilmetil*-O-*benzil-D-valina (19c)* e N-*(4-fenoxibenzenosulfonil)*-N-*terc-butoxicarbonilmetil-D-valina (3d)*
Seguiu-se um procedimento idêntico ao descrito para **1c-1d**, partindo do **3b**. Obteve-se no final um óleo amarelo como sendo o produto (rendimento global 79%).

N-*(4-fenoxibenzenosulfonil)*-N-*terc-butoxicarbonilmetil*-O-*benzil-D-valina (3c):*
^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.83 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar***H***), 7.40 (t, J = 7.8 Hz, 2H, Ar***H***), 7.35-7.19 (m, 6H, Ar***H***), 7.02 (d, J = 8.1 Hz, 2H, Ar***H***), 6.90 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar***H***), 5.00, 4.85 (dd, J = 12.3, 12.0 Hz, 2H, C***H***$_2$Ph),

4.24, 3.91 (dd, J = 18.3, 18.6 Hz, 2H, C***H***$_2$CO$_2$tBu), 4.02 (d, J = 10.5, 1H, NC***H***(iPr)), 2.08-2.01 (m, 1H, C***H***(CH$_3$)$_2$), 1.44 (s, 9H, tBu***H***), 1.00 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.87 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 498 (M-tBu+2H)$^+$, 576 (M+Na)$^+$, 520 (M-tBu+H+Na)$^+$, 576 (M+Na)$^+$.

N-*(4-fenoxibenzenosulfonil)*-N-*terc-butoxicarbonilmetil-D-valina (3d):*

P.f. 97-99 °C; ^{1}H-RMN (CDCl$_3$), δ (ppm): 8.01 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar***H***), 7.36 (t, J = 7.8 Hz, 2H, Ar***H***), 7.17 (t, J = 7.4 Hz, 1H, Ar***H***), 6.96 (d, J = 7.8 Hz, 2H, Ar***H***), 6.79 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar***H***), 4.24, 4.10 (dd, J = 18.0, 18.3 Hz, 2H, C***H***$_2$CO$_2$tBu), 3.62 (d, J = 10.2, 1H, NC***H***(iPr)), 1.98-1.91 (m, 1H, C***H***(CH$_3$)$_2$), 1.43 (s, 9H, tBu***H***), 0.86 (d, J = 6.0 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.25 (d, J = 5.7 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 452 (M-tBu+2Na)$^+$, 430 (M-tBu+H+Na)$^+$, 486 (M+Na)$^+$.

Ácido N-*(4-fenoxibenzenosulfonil)*-N-*terc-butoxicarbonilmetil*-O-*benzil-D-valino-hidroxâmico (3e)*

Foi seguido um procedimento idêntico ao usado na preparação de **1e**, partindo de **3d**, tendo-se obtido um sólido amarelado como o produto puro (rendimento 77%).

P.f. 45-48 °C; ^{1}H-RMN (CDCl$_3$), δ (ppm): 8.97 (s, 1H, CON***H***OBn), 7.84 (d, J = 9.3 Hz, 2H, Ar***H***), 7.46-7.36 (m, 7H, Ar***H***), 7.22 (t, J = 7.3 Hz, 1H, Ar***H***), 7.05-7.01 (2d, 4H, Ar***H***), 4.92 (s, 2H, C***H***$_2$Ph), 4.14, 3.90 (dd, J = 17.7, 18.3 Hz, 2H, C***H***$_2$CO$_2$tBu), 3.30 (d, J = 10.5, 1H, NC***H***(iPr)), 2.15-2.07 (m, 1H, C***H***(CH$_3$)$_2$), 1.47 (s, 9H, tBu***H***), 0.79 (d, J = 6.9 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.49 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 513 (M-tBu+2H)$^+$, 591 (M+Na)$^+$, 569 (M+H)$^+$.

Ácido N-*(4-fenoxibenzenosulfonil)*-N-*hidroxicarbonilmetil*-O-*benzil-D-valino-hidroxâmico (3f)*

Foi seguido um procedimento semelhante ao usado com o **1f** mas usando o **3e** como material de partida. Neste caso, as extracções a pH 6 foram realizadas com éter etílico em vez de CH_2Cl_2, tendo-se lavado a fase orgânica final com uma solução Na_2HPO_4 1% (4×). Após secagem da fase orgânica resultante sobre Na_2SO_4 anidro e evaporação do solvente, o produto puro foi obtido como um sólido branco (rendimento 62%). P.f. 69-70 °C; ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 8.80 (s, 1H, CON***H***OBn), 7.80 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar***H***), 7.43-7.38 (m, 7H, Ar***H***), 7.23 (t, J = 7.6 Hz, 1H), Ar***H***, 7.05-7.01 (2d, 4H, Ar***H***), 4.89 (s, 2H, C***H***$_2$Ph), 4.29, 4.01 (dd, J = 18.3, Hz, 2H, C***H***$_2$CO$_2$H), 3.36 (d, J = 10.5, 1H, NC***H***(iPr)), 2.17-2.06 (m, 1H, C***H***(CH$_3$)$_2$), 0.79 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 0.47 (d, J = 6.0 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 535 $(M+Na)^+$, 513 $(M+H)^+$.

4-(4-Fenoxibenzenosulfonil)-(R)-3-isopropil-1-benziloxi-piperazino-2,6-diona (3g)

Seguiu-se um procedimento semelhante ao da preparação de **1g**, partindo do **3f**. Obteve-se o produto puro como um sólido branco higroscópico (rendimento 44%). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.73 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar***H***), 7.43-7.38 (m, 4H, Ar***H***), 7.25-7.15 (m, 4H, Ar***H***), 7.03 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar***H***), 6.83 (d, J = 7.8 Hz, 2H, Ar***H***), 4.73, 4.07 (dd, J = 18.0, 19.5 Hz, 2H, NC***H***$_2$CON), 4.44, 4.39 (dd, J = 8.7, 8.4 Hz, 2H, C***H***$_2$Ph), 4.23 (d, J = 10.2, 1H, NC***H***(iPr)CON), 2.01-1.92 (m, 1H, C***H***(CH$_3$)$_2$), 1.12 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CHC***H***$_3$), 1.05 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CHC***H***$_3$); m/z (FAB): 495 $(M+H)^+$, 517 $(M+Na)^+$.

4-(4-Fenoxibenzenosulfonil)-(R)-3-isopropil-1-hidroxi-piperazino-2,6-diona (3)

Realizou-se a hidrogenação catalítica do **3g** segundo o procedimento habitual, com H_2 1.5 bar. Recristalizando o

resíduo final com éter etílico/éter de petróleo obteve-se o produto puro como um sólido branco higroscópico (rendimento 96%). ^{1}H-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 7.68 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar***H***), 7.40 (t, 2H, Ar***H***), 7.42 (t, J = 7.8 Hz, 1H, Ar***H***), 7.06-7.03 (2d, 4H, Ar***H***), 4.75, 4.12 (dd, J = 19.8, 19.2 Hz, 2H, NC***H***$_2$CON), 4.28 (d, J = 9.6 Hz, 1H, NC***H***(iPr)CON), 2.14-2.03 (m, 1H, C***H***$(CH_3)_2$), 1.16-1.11 (2d, 6H, CH(C***H***$_3)_2$); ^{13}C-RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 164.5, 162.7 (2 picos, ***C***=O), 162.1, 154.7, 130.0, 125.2, (4 picos, *para* e *ipso*-Ar-***C***), 130.2, 129.2, 120.3, 118.3 (4 picos, *orto* e *meta*-Ar-***C***), 63.9 (***C***CH$(CH_3)_2$), 45.4 (N***C***H$_2$CO), 29.2 (***C***H$(CH_3)_2$), 20.0, 19.0 (2 picos, CH(***C***H$_3)_2$); m/z (FAB): 427 $(M+Na)^+$, 405 $(M+H)^+$. Análise Elem.: calc. ($C_{19}H_{20}N_2O_6S \cdot 0.3H_2O$): C, 55.61; H, 5.07; N, 6.83%; S, 7.81%; enc.: C, 55.72; H, 4.92; N, 6.55%; S, 7.55%.

EXEMPLO 4

Propriedades de inibição enzimática

Tabela 1 - Actividade inibitória dos compostos **1-3** sobre as MMPs seleccionadas, assim como as respectivas selectividades pela MMP-2 relativamente à MMP-1 (em itálico).*

	IC_{50} (nM) [a]				
Composto	**MMP-1**	*Selectiv. MMP-2/-1*	**MMP-2**	**MMP-8**	**MMP-14**
1	(4.96±0.40) $\times 10^3$	*4.2*	(1.19±0.05) $\times 10^3$		
2	(1.33±0.21) $\times 10^3$	*5.5*	241 ± 17		
3	(1.60±0.11) $\times 10^3$	*53.3*	30 ± 5	21 ± 3	83 ± 3

* a selectividade de inibição de uma enzima em relação a outra é dada como o inverso da razão dos respectivos valores de IC_{50}.
[a] Os valores de IC_{50} foram obtidos de acordo com os ensaios enzimáticos descritos no Exemplo 5.

EXEMPLO 5

Métodos e Medições

Caracterização dos compostos

Os pontos de fusão foram medidos com um microscópio Leica Gallen III e os valores não foram corrigidos.

Foram traçados espectros de ^{1}H-RMN (ressonância magnética nuclear de protão) para todos os compostos sintetizados sendo, juntamente com as restantes técnicas, suficientes para identificar e caracterizar todos os compostos. No entanto, como método complementar de caracterização, foram traçados os espectros de ^{13}C-RMN (ressonância magnética nuclear de carbono-13) de alguns compostos representativos. Os espectros de ^{1}H-RMN foram traçados com um espectrómetro Varian Unity 300, a 25 °C, os espectros de ^{13}C-RMN foram obtidos com um espectrómetro Bruker Avance II 400, também a 25 °C, e os desvios químicos, em ppm (δ), foram definidos com base em referências internas *standard*, nomeadamente tetrametilsilano (TMS) para solventes orgânicos ou 3-(trimetilsililo)-[2,2,3,3-d4]-propionato de sódio (DSS) para soluções aquosas deuteradas. Na descrição dos espectros de RMN foram usadas as seguintes abreviaturas: s = singuleto, d = dupleto, dd = duplo dupleto, t = tripleto, m = multipleto, 2d = dois dupletos sobrepostos.

Os espectros de massa FAB (bombardeamento com átomos rápidos) foram traçados com um espectrómetro VG TRIO-2000 GC/MS e, no caso de existirem vários picos, eles são apresentados por ordem decrescente de intensidades.

As análises elementares foram realizadas pelo Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico com um aparelho Fison EA1108 CHNF/O.

Ensaios enzimáticos

As recombinantes humanas das pró-gelatinases (pró-MMP-2 e pró-MMP-9) foram preparadas neste laboratório a partir das de células de mieloma de rato transfectadas. A Matrilisina (pró-MMP-7, recombinante humana), MMP-TipoMembrana-1 (MT1-MMP, o mesmo que a pró-MMP-14, recombinante humana) e CD-MMP-16 (domínio catalítico da MT3-MMP) foram adquiridas (*Calbiotech*). As pró-enzimas foram activadas imediatamente antes da sua utilização com acetato *p*-aminofenilmercúrico (2 nM de APMA durante 1 h a 37 °C para a pró-MMP-2, 1 nM de APMA durante 1 h a 37 °C para a pró-MMP-7 e pró-MMP-9), e com tripsina 5 μg/mL (durante 10 min a 37°C) seguido do inibidor de tripsina de soja (SBTI, *Soybean trypsin inhibitor*) 50 μg/mL para a pró-MMP-14.
Todos os reagentes químicos e solventes eram de grau analítico e foram usados tal como fornecidos pelo fabricante sem purificação adicional.

Para os ensaios de inibição, as soluções *stock* dos inibidores em DMSO (100 mM) foram diluídas em sete concentrações diferentes (1 nM-300 μM), para cada MMP, com a solução tampão recomendada para os ensaios fluorimétricos (*Fluorimetric Assay Buffer*, FAB): Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, $CaCl_2$ 10 mM, Brij 35 0.05% e DMSO 1%. A enzima activada (com concentrações finais de 2.8 nM para MMP-2, 2.36 nM para MMP-7, 2.7 nM para MMP-9, 2.15 nM para MMP-14 e 2.2 nM para CD-MMP-16) e as

soluções do inibidor foram incubadas no tampão de ensaio durante 4 h a 25 °C.

Após adição da solução do substrato fluorogénico (Mca-Pro-Leu-Gli-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH_2 (Mca = (7-metoxicumarino-4-il)acetilo; Dpa = *N*-3-(2,4-dinitrofenil)-L-2,3-diaminopropionilo) 100 μM em DMSO (concentração final de 2 μM), a hidrólise foi monitorizada a cada segundo, durante 5 min, registando o aumento de fluorescência (λ_{ex} = 328 nm, λ_{em} = 398 nm) utilizando um espectrofluorímetro modelo M-2 Gemini da Molecular Devices. Os ensaios foram realizados em duplicado, com um volume total de 200 μL por célula. A actividade da MMP é expressa em unidades de fluorescência relativa (RFU) e a percentagem de inibição é calculada em relação à reacção de controlo na ausência do inibidor.

Os resultados foram analisados através dos programas SoftMax Pro e GraFit.

Lisboa, 09 de Dezembro de 2008

RESUMO

"INIBIDORES DE METALO-ENZIMAS COM POTENCIAL APLICAÇÃO CLÍNICA: DERIVADOS 1-HIDROXIPIPERAZINO-2,6-DIONA COMO UM NOVO GRUPO DE LIGAÇAO AO ZINCO"

A presente invenção refere-se a novos compostos com elevada capacidade de inibição de metaloproteinases contendo zinco no centro activo. Os inibidores aqui desenvolvidos possuem um novo tipo de grupo quelante do iao zinco(II) no centro catalitico enzimático, do tipo 1-hidroxipiperazino-2,6-diona, um heterociclo com um anel de seis membros. Estes compostos podem ser derivados do ácido iminodiacético ou de outros aminoácidos, contendo ou não centros de quiralidade num ou mais átomos de carbono do anel, e possuir 4-*N*-substituintes lipófilos, adequadamente seleccionados. Estes novos compostos demonstraram elevada actividade inibitória (de ordem nanomolar) e selectividade com algumas metaloproteinases matriciais (MMPs) e ainda estabilidade, pelo que apresentam potencialidade na sua aplicação farmacológica.