



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0401908-3 A**

(22) Data de Depósito: 04/06/2004  
(43) Data de Publicação: 17/01/2006  
(RPI 1828)



(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:  
C07K 14/81  
A61K 38/16  
A61P 37/00

(54) Título: **COMPOSTOS INIBIDORES DE SERINA  
PROTEASE, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO  
PARA TRATAMENTO DE FLAVIVIROSES**

(71) Depositante(s): Universidade Federal do Rio de Janeiro -  
UFRJ (BR/RJ)

(72) Inventor(es): Octavio Augusto Ceva Antunes, Jeronimo da  
Silva Costa, Magaly Girão Albuquerque, Ricardo Bicca de Alencastro,  
Estela Maris Freitas Muri, Marcelo de Lima Bastos, Ricardo Hernández  
Valdés, Elaine Fontes Ferreira da Cunha, Marlito Gomes Junior

(74) Procurador: Armenio dos Santos Evangelista

(57) Resumo: "COMPOSTOS INIBIDORES DE SERINA PROTEASE, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO PARA TRATAMENTO DE FLAVIVIROSES". Refere-se a presente invenção a compostos inibidores de serina protease sintéticos tendo um eixo de simetria  $C_2$ , possuindo na porção central uma estrutura do tipo 1,4:3,6-dianidromanitol e, nas porções laterais, ligações peptidomiméticas com aminoácidos, como por exemplo, lisina (Lis), fenilalanina (Phe), dentre outros, utilizados como base para a preparação de formulações antivirais capazes de cessar a proliferação dos vírus responsáveis pela maioria das flaviviroses, como por exemplo, hepatite C, Dengue e febre do oeste do Nilo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção COMPOSTOS INIBIDORES DE SERINA PROTEASE, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO PARA TRATAMENTO DE FLAVIVIROSES.

5 Campo da Invenção

Refere-se a presente invenção a inibidores de serina protease sintéticos tendo um eixo de simetria  $C_2$ , possuindo na porção central uma estrutura do tipo 1,4:3,6-  
 10 dianidromanitol e, nas porções laterais, ligações peptidomiméticas com aminoácidos, como por exemplo, lisina (Lis), fenilalanina (Phe), dentre outros. Esses novos inibidores de serina protease são a base para a preparação de formulações antivirais capazes de cessar a proliferação  
 15 dos vírus responsáveis pela maioria das flaviviroses, como por exemplo, hepatite C, Dengue e febre do oeste do Nilo.

Fundamentos da Invenção

20 A família *Flaviviridae* compreende mais de 60 viroses, muitas das quais são patogênicas ao ser humano. Dentre as flaviviroses encontram-se o vírus da Hepatite C, o vírus da Febre do Oeste do Nilo e o vírus da Dengue. Infecção pelo vírus da Hepatite C é amplamente reconhecida como um grande  
 25 problema de saúde pública, com mais de 200 milhões de pessoas infectadas no mundo. Essa infecção normalmente torna-se uma doença crônica conduzindo a uma disfunção hepática e carcinoma hepatocelular. A atual terapia, baseada em alfa interferon e ribavirina, é parcialmente  
 30 efetiva e é limitada pelos seus efeitos adversos (Houghton, M.; Weiner, A.; Han, J.; Kuo, G.; Choo, Q.-L. *Hepatology* 1991, 14, 381-88. Bruix, J.; Cavalet, X.; Costa, J.; Ventura, M.; Bruguera, M.; Castillo, R.; Barrera, J.M.;

Ercilla, G.; Sanchez-Tapias, J.M.; Vall, M.; Bru, C.; Rodes, J. *Lancet* ii 1989, 1004-06. Wright, M.; Main, J.; Thomas, H. C. *Chem. Chemother.* 2001, 12, 201-212).

5 Por muitos anos, a Febre do Oeste do Nilo tem sido reconhecida como uma das mais amplamente distribuídas viroses, afetando a África, a Europa, o Oriente Médio, o oeste da Ásia, e em 1999, a Febre do Oeste do Nilo se estabeleceu nos Estados Unidos. Em regiões endêmicas, a doença é assintomática ou simplesmente caracterizada por  
10 febre, dor de cabeça, dores no corpo, mialgia, etc... Entretanto, epidemias humanas tem sido descritas com sintomas severos como hepatite, meningite, encefalite, podendo conduzir à paralisia e coma, resultando em morte. Atualmente, não há uma vacina disponível para o controle da  
15 doença. O controle da população de mosquitos é a única estratégia prática atualmente empregada, mas que se torna difícil em áreas urbanas (Hayes, C. G. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*; Vol. V, Monath, T.P., CRC, Boca Raton, FL, 1989; pp.59-88. Pletnev, A. G.; Putnak, R.;  
20 Speicher, J.; Wagar, E. J.; Vaughn, D. W. *PNAS* 2002, 99, 3036-3041).

O Dengue é uma infecção aguda causada por um vírus que apresenta 4 sorotipos, denominados Dengue 1 a 4. A doença originou-se na Ásia, onde o vírus circulava através  
25 de mosquitos como o *Ae. albopictus* em ciclos silvestres envolvendo vertebrados e o homem. Com a disseminação a partir da África do vetor *Ae. aegypti*, que apresenta características de estreito relacionamento a populações humanas, surgiram os ciclos urbanos com transmissão de  
30 homem a homem e que vieram a alcançar as Américas através da colonização ibérica. A doença foi relatada no século XVIII no costa leste dos Estados Unidos e se implantou de forma endêmica na América Central e Caribe, alcançando

posteriormente a América do Sul. O vírus da Dengue afeta mais de 20 milhões de pessoas anualmente, sendo, em grande parte, responsável pela mortalidade em áreas tropicais e sub-tropicais. Causam a febre da Dengue, Dengue hemorrágica e choque. Atualmente não há vacina aprovada ou uma terapia anti-viral efetiva para essa doença (World Health Organization, 1996, Report N117. Geneva: World Health Organization. Yusof, R.; Clum, S.; Wetzel, M.; Murthy, H. M. K.; Padmanabhan, R. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 9963-10 9969).

O gênero *Flavivírus* compreende agentes com estrutura esférica de 40 a 50 nm de diâmetro e genoma de cadeia simples, de senso positivo e com aproximadamente 11 kb de comprimento e pequenas diferenças no número de nucleotídeos em relação ao tipo de vírus. A porção codificante, 15 flanqueada por regiões 5' e 3' não codificantes, induz uma poliproteína precursora, com pouco menos de 4000 aminoácidos. Após o seu processamento em sucessivas clivagens, envolvendo proteases virais e da célula este polipeptídeo vai dar origem a sete proteínas virais 20 maduras: Cap5'-C-M-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'. Além das proteases da célula hospedeira o vírus da Dengue codifica uma serino-protease (NS3pro) a qual é responsável por clivagens *in cis* e *in trans* no polipeptídeo precursor e sua atividade é essencial para o sucesso da replicação 25 viral. A NS3pro apresenta três funções distintas: a) a parte C-terminal apresenta uma atividade de tropfosfatase e helicase, b) A parte N-terminal apresenta a função protease propriamente dita. A NS3pro é uma serino protease semelhante a tripsina e apresenta no seu sítio catalítico a 30 triade His51-Asp75-Ser135. De uma maneira análoga a tripsina a NS3pro tem preferência de corte para resíduos de aa básicos (i.e. Arg e Lys) e requer, para atingir uma

atividade proteolítica ótima, de outros co-fatores que são supridos pela proteína não-estrutural NS2B. O conjugado proteico NS2-NS3 foi demonstrado *in vivo* e este pode clivar com grande eficiência a poliproteína nas junções NS2A/NS2B, NS2B/ NS3, NS3/NS4A e NS4B/NS5 assim como nos sítios internos dentro da C, NS2A, NS3, and NS4A. O resto das clivagens proteolíticas são catalisadas por proteases da célula hospedeira (furina e signalases). A atividade do co-fator NS2 está localizado na parte central da molécula, nos 40 aa do domínio hidrofóbico da molécula (Biedrzycka, A.; Cauchi, M.R.; Bartholomeuzs, A.; Gorman, J.J.; Wright, P.J. *J. Gen. Virology*, 1987, 69, 1317-1326. Chang, G-J. *Dengue and Dengue hemorrhagic fever*. Eds: DJ Gubler & G Kuno, Cab International, New York, 1997, pags: 175-198. Halstead, S.B. *Curr. Op. Infect. Dis.*, 1990, 3, 434-438. Speight, G.; Cota, G.; Parker, M.D.; Westway, E.G. *J. Gen. Virology*, 1988, 69, 23-34. Stocks, C.E. Lobigs, M. *J. Virology*, 1995, 69, 8123-8126). A importância da interação NS3pro/NS2 para atividade catalítica da protease do vírus da Dengue foi demonstrada através da expressão das duas proteínas em *E. Coli*. Somente foi verificada a clivagem dos substratos quando as duas subunidades foram adicionadas à reação. Assim, a NS3pro é um alvo molecular ideal para inibição da replicação do vírus da Dengue.

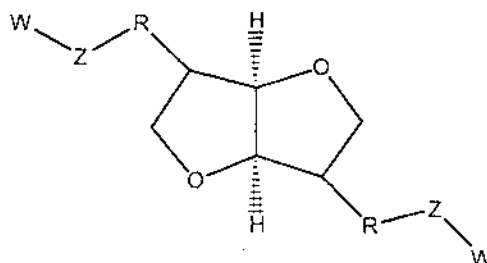
Vários trabalhos têm sido relatados sobre inibidores de serina protease. Recentemente, foi desenvolvida uma série de peptídeos sintéticos com atividade inibitória para protease NS3. O Ki desses inibidores variou de 330 a 16  $\mu\text{M}$ . Porém, estes compostos não foram testados *in vivo* (Leung, D.; Schroder, K.; White, H.; Fang, N.-X.; Stoermer, M. J.; Abbenante, G.; Martin, J. L.; Young, P. R.; Fairlie, D. P. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 45762-45771). Os valores de Ki obtidos ainda são muito altos para que um inibidor possa

ser utilizado clinicamente. Valores de  $K_i$  na faixa de nanomolar são desejáveis para uso clínico, por exemplo, os inibidores da protease do vírus HIV tem  $K_i$ s na faixa de 10 a 20 nM. Uma vez que se conhece a estrutura da protease e de posse destes resultados, é possível, através de cálculos QSAR, docking, linking e/ou building, selecionar possíveis inibidores enzimáticos.

Os trabalhos descritos por Pessi e colaboradores são relevantes na pesquisa de novos inibidores de serina protease de HCV. (Ingallinella, P.; Fattori, D.; Altamura, S.; Steinkühler, C.; Koch, U.; Cicero, D.; Bazzo, R.; Cortese, R.; Bianchi, E.; Pessi, A. *Biochemistry*, 2002, 41, 5843-5492. Ingallinella, P.; Bianchi, E.; Ingenito, R.; Koch, U.; Steinkühler, C.; Altamura, S.; Pessi, A. *Biochemistry*, 2000, 39, 12898-12906). Este grupo descreve a obtenção de inibidores peptídicos e não-peptídicos, que foram analisados por dicroísmo circular, técnicas de R.M.N., dentre outras, para analisar seus mode de interação com a enzima alvo. Os compostos mais ativos mostraram-se promissores apresentando  $IC_{50}$  na faixa de 2-10 $\mu$ M.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É objetivo da presente invenção, prover novos e eficazes inibidores de serina protease  $C_2$ -simétricos de fórmula geral I, a seguir:



(I)

R sendo -O- ou -NH com configurações exo e endo, respectivamente; Z sendo os L-aminoácidos: Ala, Val, Phe, Pro, Lis, His, OMeGlu, PiroGlu; e W sendo o grupo de proteção di-*t*-butil-dicarbonato (Boc).

5 Os termos "Ala", "Val", "Phe", "Pro", "Lis", "His", "OMeGlu" e "PiroGlu" conforme aqui usados referem-se a alanina, valina, fenilalanina, prolina, lisina, histidina, ácido 5-O-metil- glutâmico e ácido piroglutâmico, respectivamente. De forma geral, a abreviação dos  
10 aminoácidos aqui utilizados seguem a nomenclatura IUPAC.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Como mencionado anteriormente, a NS3pro é uma serina  
15 protease semelhante à tripsina apresentando no seu sítio catalítico a tríade His51-Asp75-Ser135. Esse conhecimento motivou a conhecer o comportamento dessa enzima e levou à pesquisa de potenciais inibidores.

A determinação do modo como a serina protease atua  
20 para possibilitar a hidrólise de peptídeos é uma característica importante na pesquisa de eficazes inibidores enzimáticos. Nesse sentido, Murthy e colaboradores mostraram a estrutura cristalográfica de uma complexo formado entre a NS3-pro e MbBBI, um potente  
25 inibidor de NS3-pro. (Murthy, H.M.K.; Judge, K.; DeLucas, L.; Padmanabhan, R. *J. Mol. Biol.*, 2000, 301, 759-767). Esse estudo de interação enzima-substrato mostrou que a enzima em questão é inibida por um mecanismo padrão, também postulado para outras serina proteases, tal como HCV serina  
30 protease. (Laskowski, M.J.; Kato, I. *Annu. Rev. Biochem.*, 1980, 49, 593-626). Foi demonstrado que a enzima NS3pro hidrolisa substratos modelo contendo resíduos de Lis e Arg, e que os resíduos que interagem com Lis/Arg do complexo,

Asp129, Tyr150 e Ser163 são absolutamente conservados.  
(Ryan, M.D.; Monaghan, S.; Flint, M. J. *Gen. Virol.*, 1998,  
79, 947-959). A estrutura desse complexo fornece base  
razoável para o planejamento de específicos inibidores de  
5 serina protease.

Os estudos de modelagem molecular por "docking"  
simulando a interação entre os potenciais inibidores e a  
enzima NS3pro foram feitos pelo pacote de programas Insight  
II 97.0 (DISCOVER<sup>®</sup>, version 2.9.7 - User Guide. Part 1.  
10 Accelrys Inc.. San Diego. Costi. M. P.; Ferrari, S. *Curr.*  
*Drug Targets*, 2001, 2, 135. Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.;  
Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E. *J. Mol. Biol.*,  
1982, 161, 269). As estruturas cristalográficas da NS3pro,  
tanto isolada como co-cristalizada com inibidores, foram  
15 obtidas a partir de banco de dados conhecidos das pessoas  
versadas na técnica, no caso o PDB (Protein Data Bank)  
(Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.;  
Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E.  
*Nucleic Acids Research*, 2000, 28, 235).

20 Essa metodologia teórica permitiu projetar os  
inibidores de serina protease da invenção e que satisfazem  
a fórmula geral I.

A partir dos dados obtidos anteriormente passou-se,  
então, a etapa de síntese dos inibidores de serina protease  
25 previstos pela fórmula geral I.

A primeira etapa na obtenção dos derivados da invenção  
consistiu na proteção dos grupamentos amina dos L-  
aminoácidos utilizados como reagentes. A proteção dos  
grupamentos amina contra reações indesejáveis durante as  
30 etapas de síntese ou com vistas de aumentar a solubilidade  
dos compostos finais foi realizada com o reagente Di-t-



butil-dicarbonato (Boc), utilizando várias condições reacionais de acordo com a tabela 1. (Feng, X.; Edstrom, A. *Tetrahedron Asymm.*, 1999, 10, 99-105. Li, H.; Sakamoto, T.; Kato, M.; Kikugawa, Y. A. *Synth. Comm.*, 1995, 25, 4045-52.

5 Adamczyk, M.; Reddy, R. E.; Rege, S. D. *Synth. Comm.*, 2000, 30, 3281-90. Barcelo, G.; Senet, J.-P.; Sennyey, G. *Synthesis*, 1986, 627-32. Le Nguyen, D.; Seyer, R.; Heitz, A.; Castro, B. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1985, 1025-31. Keller, O.; Keller, W. E.; vanLook, G.; Wersin, G. *Org.*

10 *Synth.*, 1985, 63, 160-70. Ookawa, A.; Soai, K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1987, 1465-71. El Marini, A.; Roumestant, M. L.; Viallefont, P.; Razafindramboa, D.; Bonato, M. Follet, M. *Synthesis*, 1992, 1104-08. Yoshifuji, S.; Tanaka, K.-I.; Kawai, T.; Nitta, Y. *Chem. Pharm. Bull.*,

15 1986, 34, 3873-78. Hogg, J. H.; Ollmann, I. R.; Haeggstrom, J. Z.; Wetterholm, A.; Samuelsson, B.; Wong, Chi-Huey. *Bioog. Med. Chem.*, 1995, 3, 1405-1415).

Tabela 1. Proteção dos L-aminoácidos com Boc

Nº	aa protegidos	Condições	Pf., °C	$\alpha_D^{25}$
1	Lys-Boc	NaHCO <sub>3</sub> , THF/H <sub>2</sub> O	-	+11.5 (CHCl <sub>3</sub> , c 1.0)
2	Ala-Boc	NaOH, tBuOH/H <sub>2</sub> O	77-78	-24.5 (AcOH, c 2.0)
3	Val-Boc	NaOH, tBuOH/H <sub>2</sub> O	75-76	+12.9 (CHCl <sub>3</sub> , c 1.0)
4	Phe-Boc	NaOH, tBuOH/H <sub>2</sub> O	68-69	+23.2 (EtOH, c 1.0)
5	His-Boc	Et <sub>3</sub> N, dioxane/H <sub>2</sub> O	165-166	+95.5 (CHCl <sub>3</sub> , c 1.0)
6	Pro-Boc	NaOH, tBuOH/H <sub>2</sub> O	120-122	-85.5 (CHCl <sub>3</sub> , c 1.0)
7	OMeGlu-Boc	NaHCO <sub>3</sub> , dioxane/H <sub>2</sub> O	75-76	+8.4 (CHCl <sub>3</sub> , c 1.0)
8	PiroGlu-Boc	NaHMDS, THF	111-112	-21.3 (CHCl <sub>3</sub> , c 1.0)

20 A próxima etapa consistiu na preparação do composto simétrico, 1,4-3,6-dianidro-D-manitol, o isomanide (9), por desidratação do D-manitol (10) em meio ácido. O isomanide (9) foi acoplado com os aa previamente protegidos, descritos na tabela 1, havendo a formação de derivados de interesse,

25 os ésteres do isomanide (11a-g). A formação dos ésteres foi

obtida pelo tratamento do composto (10) com 2,0 eq. dos respectivos aa protegidos e 2,0 eq. de dicloexilcarbodiimida (DCC) a temperatura ambiente por 12h, em um solvente orgânico não polar como o diclorometano. O objetivo principal nessa etapa de acoplamento seria a utilização de condições que evitasse a racemização, o que foi conseguido, obtendo assim, compostos opticamente puros. (Wiggins, L. F. *J. Chem. Soc.*, 1945, 4. Benoiton, N. L.; Lee, Y. C.; Chen, F. M. F. *Int. J. Pep. Proteins Res.*, 1993, 41, 587-594. Barany, G.; Albericio, F. J. *Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 4936-4942).

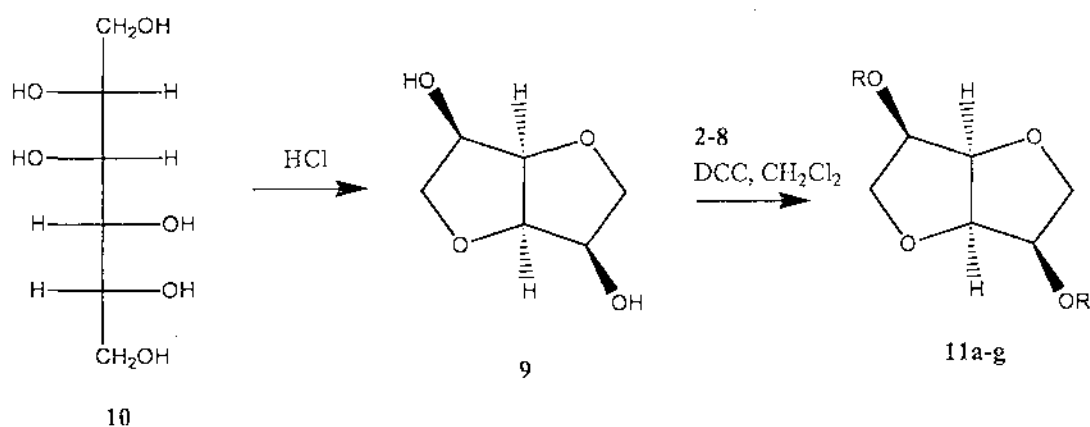


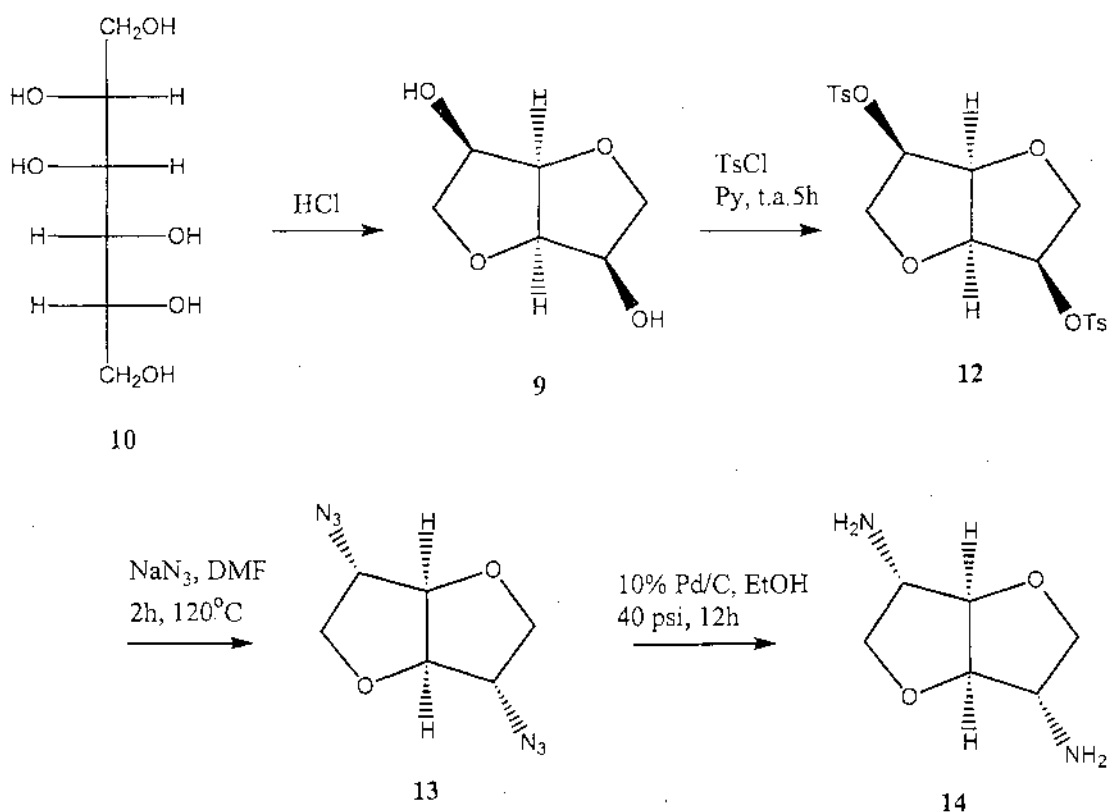
Tabela 2. Obtenção dos compostos 11a-g

Composto	R	Pf., °C	$\alpha_D^{27}$ (c, 1,0) CHCl <sub>3</sub>
11a	Ala-Boc	105-106	+89,0
11b	Val-Boc	-	+85,1
11c	Phe-Boc	55-56	+105,3
11d	His-Boc	74-75	+72,2
11e	Pro-Boc	-	+16,3
11f	OMeGlu-Boc	-	+91,9
11g	PiroGlu-boc	-	+21,3

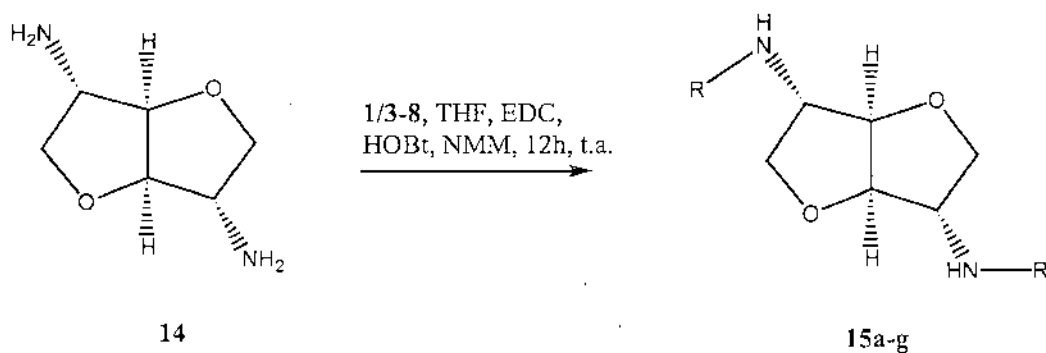
Uma nova série de compostos inibidores foi obtida utilizando o mesmo material de partida descrito acima, o D-manitol. O isomanide (9) foi convertido ao di-tosilado (12) por reação com cloreto de p-toluenosulfonila em piridina

por 5h a temperatura ambiente e mais 1h a 100 °c. O tratamento do di-tosilado (12) com azida de sódio em *N,N*-dimetilformamida a 120°C por 2h forneceu a di-azida (13), com inversão de configuração. Redução da di-azida (13) com paládio sobre carbono em etanol por 12h utilizando uma pressão de 40psi resultou na di-amina (14), que foi o substrato para a formação de novas amidas simétricas derivadas do isomanide (15a-g) mostrado no esquema 1 (Archibald, T., G.; Baum, K. *Synth. Comm.*, 1989, 19, 1493-1498. Hockett, R. C.; Fletcher Jr., H. G.; Sheffield, E. L.; Goepf Jr., R. M.; Soltzberg. *J. Chem. Soc.*, 1946, 68, 930-935. Kuszmann, J.; Medgyes, G. *Carbohydr. Res.*, 1980, 85, 259-269).

Esquema 1. Síntese dos compostos intermediários para a obtenção da di-amina 14.



A etapa chave dessa síntese foi a reação de acoplamento da di-amina (14) com os **aa** protegidos, que foi obtida pelo uso de condições clássicas de formação de ligação peptídica, ou seja, um reagente carbodiimida, o hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) em presença de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) e *N*-metilmorfolina (NMM) (Tabela 3).



10

Tabela 3. Obtenção dos compostos **15a-g**

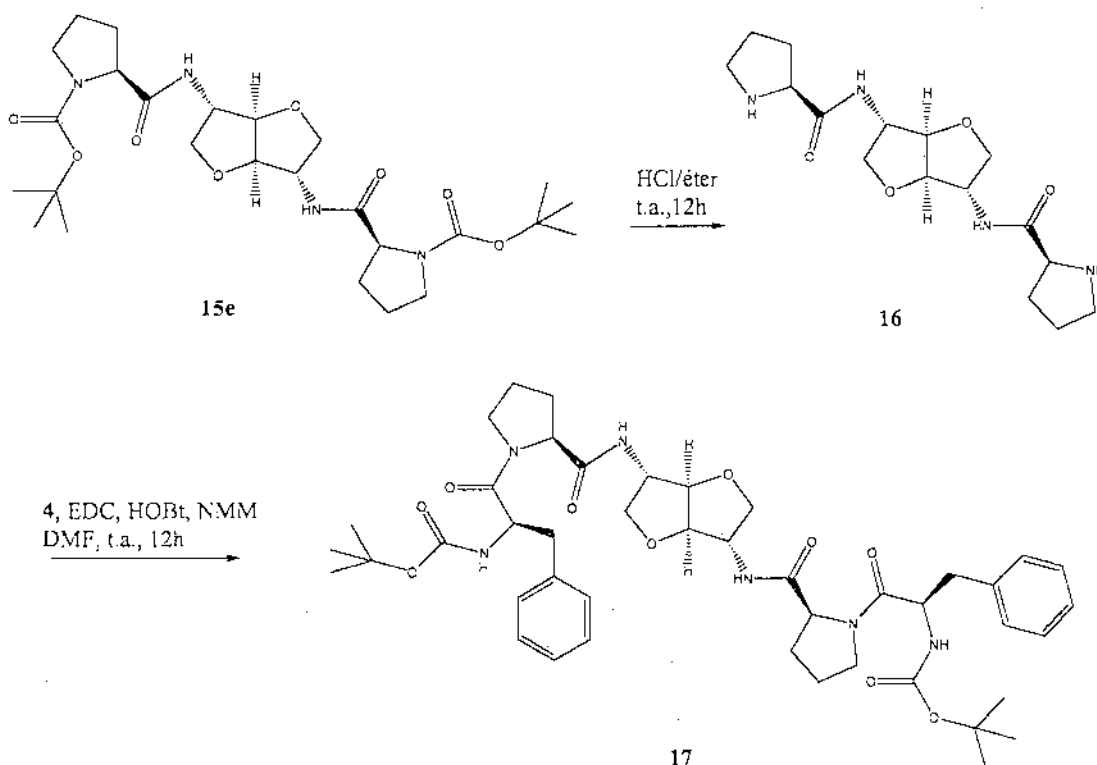
Composto	R	Pf., °C	$\alpha_D^{27}$ (c, 1,0) CHCl <sub>3</sub>
15a	Lis-Boc	85-86	-3,6
15b	Val-Boc	198-199	-16,7
15c	Phe-Boc	203-204	+35,5 (DMF)
15d	His-Boc	115-116	+46,8
15e	Pro-Boc	87-88	-54,7
15f	OMeGlu-Boc	69-70	-
15g	PiroGlu-boc	164-165	-13,3

15

Um novo composto dipeptídeo formado a partir da amida (15e) foi obtido podendo originar a uma nova série de compostos peptídicos potenciais inibidores de serina protease. O derivado (15e) foi desprotegido usando uma solução de HCl em éter a temperatura ambiente por 4h, obtendo assim, a amina livre (16). Usando as mesmas

condições de acoplamento descritas acima para a formação de nova ligação peptídica, ou seja, EDC, HOBT e NMM a temperatura ambiente por 12h, trocando o solvente THF por DMF, obteve-se o dipeptídeo (17) por acoplamento da amina livre (16) com o fenilalanina Boc-protégida (4), conforme mostrado no esquema 2 a seguir:

Esquema 2. Síntese do derivado dipeptídeo 17.



10

A presente invenção será descrita detalhadamente através dos exemplos apresentados abaixo. É necessário frisar que a invenção não está limitada a esses exemplos e inclui variações e modificações dentro dos limites nos quais ela se aplica.

Exemplo 1: Obtenção do N-t-Butoxicarbonil-L-lisina (composto 1).

Di-*t*-butildicarbonato (20,5 mmol, 4,34g) dissolvido em THF (8mL) foi adicionado à uma solução de L-lisina (1g, 6,84 mmol) previamente dissolvida em solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub> 10% (50 mL). A mistura foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente por 12h. Após esse período, o solvente foi evaporado em vácuo e o pH da mistura foi ajustado a 3 usando uma solução aquosa de HCl 10% e o produto foi extraído com acetato de etila (3 x 200mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (200mL), sêca com sulfato de sódio e evaporada em vácuo, fornecendo o produto 1 (2,06g). <sup>1</sup>H RMN δ (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 8,02 (br s, 1H, -NH), 6,23 (br s, 1H, -NH), 4,31-4,11 (m, 1H, -CH), 3,13-3,06 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 2,00-1,73 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 1,45 (s, 9H, -CH<sub>3</sub>), 1,43 (s, 9H, -CH<sub>3</sub>), 1,28-1,26 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>). α<sub>D</sub><sup>27</sup> = +11,5 (c, 1.0) CHCl<sub>3</sub>.

Exemplo 2: Obtenção do N-*t*-Butoxicarbonil-L-prolina (composto 6).

L-Prolina (17,39 mmol, 2g) e hidróxido de sódio (20,1 mmol, 0,807g) foram dissolvidos em uma mistura de *t*-butanol-água (30 mL, 1:1, v/v). A essa solução foi adicionado di-*t*-butildicarbonato (21,1 mmol, 4.36g) em uma porção. A mistura foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente por 12h. Após esse período, a fase aquosa foi tratada com solução aquosa de ácido acético 20% ajustando o pH da mistura a 3 e o produto foi extraído com acetato de etila (3 x 200mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (200mL), sêca com sulfato de sódio e evaporada em vácuo. O produto foi recristalizado em clorofórmio/hexano a 0°C fornecendo o produto 6 (2,27g). <sup>1</sup>H RMN δ (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 9,24 (br s,

1H, -OH), 4,27-4,20 (m, 1H, -CH), 3,50-3,48 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>),  
2,12-1,84 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 1,43 (s, 9H, -CH<sub>3</sub>). PF 120-122°C.  
 $\alpha_D^{27} = -85,5$  (c, 1,0) CHCl<sub>3</sub>.

5 Exemplo 3: Obtenção do N-t-Butoxicarbonil-L-alanina  
(composto 2).

O composto 2 foi obtido de acordo com o processo  
descrito para o composto 6. RMN <sup>1</sup>H  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 9,38  
10 (br s, 1H, -OH), 5,13 (br s, 1H, -NH), 4,31-4,15 (m, 1H, -  
CH), 1,43 (s, 9H, -CH<sub>3</sub>), 1,41 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>). PF 77-78°C.  $\alpha_D^{25}$   
= -24,5 (c, 2,0) AcOH.

15 Exemplo 4: Obtenção do N-t-Butoxicarbonil-L-valina  
(composto 3).

O composto 3 foi obtido de acordo com o processo  
descrito para o composto 6. <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  
10,25 (br s, 1H, -OH), 5,12 (br s, 1H, -NH), 4,21-4,10 (m,  
20 1H, -CH), 2,16-2,00 (m, 1H, -CH), 1,42 (s, 9H, -CH<sub>3</sub>), 0,97-  
0,91 (m, 6H, -CH<sub>3</sub>). PF 75-76°C.  $\alpha_D^{25} = +12,9$  (c, 1,0) CHCl<sub>3</sub>.

25 Exemplo 5: Obtenção do N-t-Butoxicarbonil-L-  
fenilalanina (composto 4).

O composto 4 foi obtido de acordo com o processo  
descrito para o composto 6. <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): (1:2  
mistura de rotâmeros) 8,10 (br s, 1H, -NH), 7,27-7,19 (m,  
5H, -CH), 6,21 (br s, 1H, -NH), 4,98 (br s, 1H, -NH), 4,60  
30 (m, 1H, -CH), 3,17-2,90 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 1,40 (s, 6H, -CH<sub>3</sub>),  
1,30 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>). PF 68-69°C.  $\alpha_D^{27} = +23,2$  (c, 1,0) EtOH.

Exemplo 6: Obtenção do N-1-Bis[-t-Butoxicarbonil]-L-histidina (composto 5).

Uma solução de di-t-butildicarbonato (16,1 mol, 3,54g) em dioxana (3,2 mL) foi adicionada à uma suspensão de L-histidina (6,44 mmol, 1g) e trietilamina (19,33 mmol, 2,7 mL) em água (3,2 mL). A mistura foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente por 12h. Ao final desse período, água foi adicionada (6mL) e a fase aquosa foi lavada com éter dietílico (3 x 50mL) e acetato de etila (3 x 50mL). O volume total foi aumentado para 200mL com acetato de etila e a solução foi acidificada a pH 3 com solução aquosa de HCl 10%. O produto foi extraído com acetato de etila (3 x 200mL) e a fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (200mL), seca com sulfato de sódio e evaporada em vácuo, obtendo-se o produto 5 (1,65g).  $^1\text{H}$  RMN  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 8,15 (s, 1H, -CH), 7,19 (s, 1H, -CH), 5,47 (br s, 1H, -NH), 4,48 (s, 1H, -CH), 3,20-3,08 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 1,59 (s, 9H, -CH<sub>3</sub>), 1,46 (s, 9H, -CH<sub>3</sub>). PF 165-166°C.  $\alpha_D^{27} = +95,5$  (c, 1,0)  $\text{CHCl}_3$ .

Exemplo 7: Obtenção do ácido N-t-Butoxicarbonil-5-O-metil-L-glutâmico (composto 7).

A uma solução de ácido 5-O-metil-L-glutâmico (6,20 mmol, 1g) em água (18 mL) foi adicionado  $\text{NaHCO}_3$  (13,6 mmol, 1,14g) a 0°C, seguido por uma solução de di-t-butildicarbonato (6,57 mmol, 1,42g) em dioxana (18 mL). A mistura foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente por 12h. A fase aquosa foi lavada com éter dietílico (3 x 20 mL). O volume total foi aumentado para 200mL com acetato de etila e a solução foi acidificada a pH



3 com solução aquosa de HCl 10%. O produto foi extraído com acetato de etila (3 x 200mL) e a fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (200mL), seca com sulfato de sódio e evaporada em vácuo, obtendo-se o produto  
5 (1,56g).  $^1\text{H}$  RMN  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 8,74 (br s, 1H, -NH), 4,33-4,22 (m, 1H, -CH), 3,70 (s, 3H, - $\text{CH}_3$ ), 2,48-2,03 (m, 4H, - $\text{CH}_2$ ), 1,43 (s, 9H, - $\text{CH}_3$ ). PF 75-76°C.  $\alpha_D^{27} = +8,4$  (c, 1,0)  $\text{CHCl}_3$ .

10 Exemplo 8: Obtenção do ácido N-t-Butoxicarbonil-L-piroglutâmico (composto 8).

O composto 8 foi obtido a partir do ácido N-t-Butoxicarbonil-O-benzil-L-piroglutâmico (4,23 mmol, 1,35g)  
15 (que foi obtido a partir do ácido L-piroglutâmico em 2 etapas) por tratamento com Pd/C (0,310g) em acetato de etila (30 mL). A mistura foi vigorosamente agitada sob uma atmosfera de  $\text{H}_2$  a 40 psi por 1h. A mistura foi filtrada sobre celite retirando assim o catalisador e concentrada em  
20 vácuo forneceu o produto que foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. O produto foi obtido em 90% de rendimento (0,872g).  $^1\text{H}$  RMN  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 8,11 (br s, 1H), 4,66-4,63 (m, 1H, -CH), 2,70-2,36 (m, 4H, - $\text{CH}_2$ ), 1,49 (s, 9H, - $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN: 175,8 (-C=O), 174,0 (-  
25 C=O), 149,3 (-C=O), 84,0 (-Cq), 58,7 (-CH), 31,1 (- $\text{CH}_2$ ), 27,8 (- $\text{CH}_3$ ), 21,4 (- $\text{CH}_2$ ). ESMS m/z 228 (M - 1). PF 111-112°C.  $\alpha_D^{29} = -21,3$  (c, 1,0)  $\text{CHCl}_3$ .

30 Exemplo 9: Processo geral para a obtenção dos derivados ésteres (compostos 11a-g).

Isomanide (9) (2 mmol) e o correspondente aa protegido (2-8) (4 mmol) foram dissolvidos em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro (10 mL). A esse solução foi adicionado DCC (4 mmol, 0,605g) a 0°C, e a mistura foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente por 12h. Após esse período, o solvente foi evaporado em vácuo e o produto purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Os correspondentes produtos foram obtido em cerca de 40% de rendimento.

2-*tert*-Butoxicarbonilamino-propionico acido 6-(2-*t*-butoxicarbonilamino-propioniloxi)-hexahidrofuro[3,2-*b*]furan-3-il ester (11a). <sup>1</sup>H RMN δ (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 5,10 (br s, 2H, -CH), 4,69 (s, 2H, -CH), 4,37 (br s, 2H, -CH), 4,03-4,01 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3,81-3,77 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 1,43 (s, 18H, -CH<sub>3</sub>), 1,39 (d, 6H, *J* = 7,18 Hz, -CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN: 173,0 (-C=O), 155,3 (-C=O), 80,6 (-CH), 80,2 (-Cq), 74,6 (-CH); 70,8 (-CH<sub>2</sub>), 49,6 (-CH), 28,7 (-CH<sub>3</sub>), 19,0 (-CH<sub>3</sub>). ESMS *m/z* 489 (M + 1). IV (KBr)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 3347, 2979, 2888, 1747, 1683, 1517, 1303, 1252, 1160, 1074, 978. Análise calculada para C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>: C, 54,09; H, 7,43; N, 5,73. Encontrada: C, 53,96; H, 7,56; N, 5,36.  $\alpha_D^{27} = + 89,0$  (c, 1,0) CHCl<sub>3</sub>, PF = 105-106°C.

2-*tert*-Butoxicarbonilamino-3-metil-butirico acido 6-(2-*t*-butoxicarbonilamino-3-metil-butoxi)-hexahidrofuro[3,2-*b*]furan-3-il ester (11b). <sup>1</sup>H RMN δ (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 5,04-5,00 (m, 2H, -CH), 4,66 (s, 2H, -CH), 4,25 (br s, 2H, -CH), 3,99-3,95 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3,76-3,72 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 2,15-1,98 (m, 2H, -CH), 1,44 (s, 18H, -CH<sub>3</sub>), 0,90 (dd, 12H, *J* = 6,7 Hz, *J* = 28,3 Hz -CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN: 172,1 (-C=O), 155,9 (-C=O), 80,6 (-CH), 80,1 (-Cq), 74,6 (-CH), 70,7 (-CH<sub>2</sub>), 58,9 (-CH), 31,6 (-CH), 28,7 (-CH<sub>3</sub>), 19,3 (-CH<sub>3</sub>), 17,9 (-CH<sub>3</sub>). ESMS *m/z* 545 (M + 1). IV (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 2970, 2932, 1742, 1710, 1504, 1365, 1308, 1246, 1162, 1095, 1017. Análise calculada

para  $C_{26}H_{44}N_2O_{10}$ : C, 57,34; H, 8,14; N, 5,14. Encontrada: C, 57,33; H, 8,20; N, 5,42.  $\alpha_D^{27} = + 85,1$  (c, 1,0)  $CHCl_3$ . O produto apresenta-se como um óleo incolor.

5 (2-*tert*-Butoxicarbonilamino-3-fenil-propionico acido 6-(2-*t*-butoxicarbonilamino-3-fenil-propioniloxi)-hexahidrofuro[3,2-*b*]furan-3-il ester (11c).  $^1H$  RMN  $\delta$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz): 7,30-7,13 (m, 10H, -CH), 5,04-5,01 (m, 2H, -CH), 4,65 (s, 2H, -CH), 4,18 (m, 2H, -CH), 3,94-3,90 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3,64-3,62 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3,10 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 1,41 (s, 18H, -CH<sub>3</sub>).  $^{13}C$  RMN: 171,7 (-C=O), 155,3 (-C=O), 136,3 (-Cq), 129,7 (-CH), 128,9 (-CH), 127,4 (-CH), 80,6 (-CH), 80,3 (-Cq), 74,6 (-CH), 70,5 (-CH<sub>2</sub>), 54,8 (-CH), 38,8 (-CH<sub>2</sub>), 28,7 (-CH<sub>3</sub>). ESMS m/z 641 (M + 1). IV (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$ : 2976, 2931, 1750, 1710, 1624, 1500, 1451, 1365, 1247, 1163, 1055. Análise calculada para  $C_{34}H_{44}N_2O_{10}$ : C, 63,74; H, 6,92; N, 4,37. Encontrada: C, 63,39; H, 7,01; N, 4,22.  $\alpha_D^{27} = + 105,3$  (c, 1,0)  $CHCl_3$ . PF = 55-56°C.

10 2-*tert*-Butoxicarbonilamino-3-metil-imidazólico acido 6-(2-*t*-butoxicarbonilamino-3-metil-imidazoliloxi)-hexahidrofuro[3,2-*b*]furan-3-il ester (11d).  $^1H$  RMN  $\delta$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7,96 (s, 2H, -CH), 7,15 (s, 2H, -CH), 5,68-5,66 (m, 2H, -CH), 5,08 (s, 2H, -CH), 4,65 (s, 2H, -CH), 3,99-3,98 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3,80-3,75 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3,08 (br s, 4H, -CH<sub>2</sub>), 1,59 (s, 18H, -CH<sub>3</sub>), 1,42 (s, 18H, -CH<sub>3</sub>).  $^{13}C$  RMN: 171,6 (-C=O), 155,6 (-C=O), 147,2 (-C=O), 138,8 (Cq), 137,2 (-CH), 115,1 (-CH), 85,9 (-Cq), 80,6 (-CH), 80,1 (-Cq), 74,7 (-CH), 70,6 (-CH<sub>2</sub>), 53,5 (-CH), 30,6 (-CH<sub>2</sub>), 28,6 (-CH<sub>3</sub>), 28,2 (-CH<sub>3</sub>). ESMS m/z 821 (M + 1). IV (KBr)  $\nu$   $cm^{-1}$ : 3388, 2979, 2932, 1755, 1712, 1490, 1391, 1289, 1254, 1159, 1055, 1011, 843. Análise calculada para  $C_{38}H_{56}N_6O_{14}$ : C, 55,60; H, 6,88; N, 10,24. Encontrada: C,

55,25; H, 7,08; N, 10,01.  $\alpha_D^{21} = + 72,2$  (c, 1,0)  $\text{CHCl}_3$ . PF= 74-75°C.

2-*tert*-Butoxicarbonilamino-3-metil-pirrolidinico acido 6-(2-*t*-butoxicarbonilamino-3-metil-pirrolidiniloxi)-

5 hexahidrofuro[3,2-*b*]furan-3-il ester (11e).  $^1\text{H}$  RMN  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 5,12-5,10 (m, 2H, -CH), 4,68-4,67 (s, 2H, -CH), 4,28-4,27 (m, 2H, -CH), 4,08-4,07 (m, 2H, - $\text{CH}_2$ ), 3,94-3,92 (m, 2H, - $\text{CH}_2$ ), 3,54-3,45 (m, 4H, - $\text{CH}_2$ ), 2,21-1,83 (m, 8H, - $\text{CH}_2$ ), 1,43 (s, 18H, - $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN: 172,8 (-C=O), 10 154,2 (-C=O), 82,1 (-CH), 80,6 (-Cq), 74,6 (-CH), 71,1 (- $\text{CH}_2$ ), 59,2 (-CH), 46,9 (- $\text{CH}_2$ ), 28,8 (- $\text{CH}_3$ ), 25,3 (- $\text{CH}_2$ ), 23,8 (- $\text{CH}_2$ ). ESMS  $m/z$ : 539 (M - 1). Análise calculada para  $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{10}$ : C, 57,76; H, 7,46; N, 5,18. Encontrada: C, 57,40; H, 7,08; N, 4,89.  $\alpha_D^{27} = + 16,3$  (c, 1,0)  $\text{CHCl}_3$ . O 15 produto apresenta-se como um óleo incolor.

2-*tert*-Butoxicarbonilamino-pentanedióico acido 1-[6-(2-*t*-butoxicarbonilamino-4-metoxicarbonil-butiriloxi)-

hexahidro-furo[3,2-*b*]furan-3-il 5-metil ester (11f).  $^1\text{H}$  RMN  $\delta$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  5,15-5,07 (m, 2H, -CH), 4,70 (s, 2H, -CH), 4,40 (br s, 2H, -CH), 4,03 (m, 2H, - $\text{CH}_2$ ), 3,81 (m, 2H, - $\text{CH}_2$ ), 3,67 (s, 6H, - $\text{OCH}_3$ ), 2,46-2,36 (m, 4H, - $\text{CH}_2$ ), 2,21-2,18 (m, 2H, - $\text{CH}_2$ ), 2,02-1,95 (m, 2H, - $\text{CH}_2$ ), 1,43 (s, 18H, - $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN:  $\delta$  173,5 (-C=O), 171,8 (-C=O), 155,6 (-C=O), 80,5 (-CH), 80,2 (-Cq), 74,6 (-CH), 70,7 (- $\text{CH}_2$ ), 53,2 25 (-CH), 52,0 (- $\text{OCH}_3$ ), 30,2 (- $\text{CH}_2$ ), 28,5 (- $\text{CH}_3$ ), 27,8 (- $\text{CH}_2$ ). ESMS  $m/z$  633 (M + 1). IV ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3349, 2977, 2931, 1738, 1713, 1632, 1583, 1515, 1445, 1366, 1251, 1166. Análise calculada para  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{14}$ : C, 51,65; H, 6,67; N, 4,63. Encontrada: C, 52,01; H, 6,98; N, 4,66.  $\alpha_D^{21} = + 91,9$  30 (c, 1,0)  $\text{CHCl}_3$ . O produto apresenta-se como um óleo incolor.

2-*tert*-Butoxicarbonilamino-3-metil-5-oxo-pirrolidinico acido 6-(2-*t*-butoxicarbonilamino-3-metil-5-oxo-pirrolidiniloxi)-hexahidrofuro[3,2-*b*]furan-3-yl ester (11g). <sup>1</sup>H RMN δ (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 5,13-5,11 (m, 2H, -CH), 4,74-4,73 (m, 2H, -CH), 4,68-4,64 (m, 2H, -CH), 4,03-3,98 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3,76-3,74 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 2,66-2,34 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>), 1,48 (s, 18H, -CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN: 173,5 (-C=O), 170,6 (C=O), 149,2 (-C=O), 83,8 (-Cq), 80,2 (-CH), 74,4 (-CH), 70,1 (-CH<sub>2</sub>), 58,9 (-CH), 31,1 (-CH<sub>2</sub>), 27,8 (-CH<sub>3</sub>), 21,8 (-CH<sub>2</sub>). ESMS m/z 569 (M + 1). Análise calculada para C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>: C, 53,45; H, 6,38; N, 4,93. Encontrada: C, 53,16; H, 6,40; N, 5,25. α<sub>D</sub><sup>27</sup> = + 21,3 (c, 1,0) CHCl<sub>3</sub>. O produto apresenta-se como um óleo incolor.

Exemplo 10: Obtenção do 1,4:3,6-Dianidro-2,5-di-*O*-*p*-tosil-D-manitol (composto 12).

A uma solução de isomanide (13,68 mmol, 2g) em piridina anidra (24 mL) foi adicionado, gota-a-gota, sob agitação magnética e a temperatura ambiente, uma solução de *p*-TSCl (27,36 mmol, 5,2g) em piridina (40mL). A mistura reacional permaneceu em agitação por 5h quando foi aquecida a 100°C por 1h. A mistura foi resfriada e vertida em uma solução de HCl 2N e gelo. O produto foi extraído com acetato de etila (3 x 200mL) e a fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio (200mL), seca com sulfato de sódio e evaporada em vácuo. O produto bruto foi recristalizado em MeOH fornecendo cristais brancos (3.72g) em 60% de rendimento. <sup>1</sup>H RMN δ (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 7,80 (d, 4H, *J*=8,1 Hz), 7,32 (d, 4H, *J*=8,1 Hz), 4,75-4,90 (m, 2H), 4,40-4,50 (m, 2H), 3,94 (dd, 2H, *J*=6,6 Hz, *J*=9,5 Hz), 3,72 (dd, 2H, *J*=7,6 Hz, *J*=9,5 Hz), 2,41 (s, 6H). <sup>13</sup>C RMN: 130,3

(-CH), 128,3 (-CH), 80,3 (-CH), 78,4 (-CH), 70,5 (-CH<sub>2</sub>),  
22,0 (-CH<sub>3</sub>).  $\alpha_D^{29} = +94,2$  (c, 1,0) CHCl<sub>3</sub>. PF 92-93°C.

Exemplo 11: Obtenção do 1,4:3,6-Dianidro-2,5-diazido-  
5 2,5-dideoxi-L-iditol (composto 13).

A uma solução do di-tosilado 12 (2,20 mmol, 1g) DMF  
anidro (20 mL) foi adicionado NaN<sub>3</sub> (6,85 mmol, 0,445g), e a  
mistura reacional permaneceu em agitação por for 2h a  
10 120°C. A mistura foi resfriada, filtrada, o filtrado foi  
evaporado em vácuo, e ao resíduo foi adicionado CHCl<sub>3</sub>  
(200mL). Os sais sólidos foram filtrados, o filtrado foi  
lavado com água, seco com sulfato de sódio e evaporado em  
vácuo. O produto bruto foi purificado por cromatografia em  
15 coluna de sílica gel fornecendo o produto como um óleo  
amarelo claro (0.258g) em 60% de rendimento. <sup>1</sup>H RMN  $\delta$   
(CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 4,64 (s, 2H, -CH), 4,00-3,85 (m, 6H, -  
CH<sub>2</sub>/-CH). <sup>13</sup>C RMN: 86,0 (-CH), 71,8 (-CH<sub>2</sub>), 65,7 (-CH). ESMS  
m/z 195 (M - 1).  $\alpha_D^{29} = +98,0$  (c, 1,0) CHCl<sub>3</sub>.

20

Exemplo 12: 1,4:3,6-dianidro-2,5-diamino-2,5-dideoxi-  
L-iditol (composto 14).

Pd/C 10% (0,127mmol, 0,140g) foi adicionado á uma  
25 solução do composto di-azida 13 (1,27 mmol, 0,25g)  
previamente dissolvido em EtOH (10 mL). A mistura  
permaneceu sob agitação em uma atmosfera de H<sub>2</sub> a 40 psi.  
Após 12h o catalisador foi removido por filtração, e lavado  
com EtOH. O solvente foi evaporado em vácuo fornecendo o  
30 produto como um sólido higroscópico em 93% de rendimento.  
<sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 4,43 (s, 2H, -CH), 3,90 (dd, 2H,  
J=4,4 Hz, J= 9,1 Hz), 3,66 (dd, 2H, J=1,9 Hz, J=9,1 Hz);

3,50 (dd, 2H,  $J=1,9$  Hz,  $J=4,4$ Hz), 1,43 (br s, 4H,  $-NH_2$ ).  $^{13}C$  RMN: 89,0 (-CH), 75,0 (-CH<sub>2</sub>), 58,0 (-CH). ESMS m/z 143 (M - 1).  $\alpha_D^{27} = + 42,1$  (c, 1,0) CHCl<sub>3</sub>. PF 64-65°C.

5 Exemplo 13: Processo geral para a obtenção dos derivados amidas (compostos 15a-g).

A uma solução do aa protegido (1/3-8) (2,65 mmol) em THF (10 mL) foram adicionados EDC (2,66 mmol, 0,510g); HOBt  
10 (2,66 mmol, 0,331g) e N-metil morfolina (3,31 mmol, 0,36 mL). Após agitação magnética por 15 min., a di-amina 14 (1,33 mmol) foi adicionada e a mistura reacional foi agitada por 12h. O solvente foi evaporado em vácuo e o resíduo obtido foi diluído em CHCl<sub>3</sub>, lavado com solução de  
15 HCl 0.1N, água, solução de NaHCO<sub>3</sub> 0.5N, e solução saturada e NaCl. A fase orgânica foi seca em sulfato de sódio e evaporada em vácuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel fornecendo todos os produtos, como sólidos brancos, em cerca de 40% de  
20 rendimento.

(3S, 6S)-bis-N-(N-tert-Butoxicarbonil-L-lisine)-1,4-dioxabicyclo[3.3.0]octano (15a).  $^1H$  RMN  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 4,67 (br s, 2H, -CH), 4,49 (s, 2H, -CH), 4,37 (br s, 2H, -CH), 3,96-3,93 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 3,10-3,04 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>),  
25 1,89-1,60 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>), 1,42 (s, 36H, -CH<sub>3</sub>), 1,30-1,26 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>).  $^{13}C$  RMN: 172,7 (-C=O), 156,3 (-C=O), 155,8 (-C=O), 86,3 (-CH), 79,8 (-Cq), 79,1 (-Cq), 72,1 (-CH<sub>2</sub>), 56,3 (-CH), 54,2 (-CH), 39,9 (-CH<sub>2</sub>), 32,1 (-CH<sub>2</sub>), 29,5 (-CH<sub>2</sub>), 28,4 (-CH<sub>3</sub>), 28,3 (-CH<sub>3</sub>), 22,6 (-CH<sub>2</sub>). ESMS m/z 799 (M - 1).  
30 Análise calculada para C<sub>38</sub>H<sub>68</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>: C, 56,98; H, 8,56; N, 10,49. Encontrada: C, 56,65; H, 8,75; N, 10,11.  $\alpha_D^{26} = - 3,6$  (c, 1,0) CHCl<sub>3</sub>. PF = 85-86°C.

(3S, 6S)-bis-N-(N-*tert*-Butoxicarbonil-L-valina)-1,4-dioxabicyclo[3.3.0]octano (15b).  $^1\text{H}$  RMN  $\delta$  (MeOD, 400 MHz): 4,50 (s, 2H, -CH), 4,30-4,28 (m, 2H, -CH), 4,00-3,96 (m, 2H, -CH), 3,84-3,81 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 1,97-1,95 (m, 2H, -CH),  
 5 1,45 (s, 18H, -CH<sub>3</sub>), 0,95 (d, 12H,  $J = 6,4$  Hz, -CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  RMN: 173,0 (-C=O), 156,4 (-C=O), 86,1 (-CH), 79,1 (-Cq), 71,3 (-CH<sub>2</sub>), 59,9 (-CH), 56,5 (-CH), 30,8 (-CH), 27,3 (-CH<sub>3</sub>), 18,3 (-CH<sub>3</sub>), 17,5 (-CH<sub>3</sub>). ESMS  $m/z$  541 (M - 1).  
 10 Análise calculada para C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>: C, 57,55; H, 8,54; N, 10,32. Encontrada: C, 57,31; H, 8,81; N, 10,51.  $\alpha_D^{26} = -16,7$  (c, 1,0) CHCl<sub>3</sub>. PF 198-199°C.

(3S, 6S)-bis-N-(N-*tert*-Butoxicarbonil-L-fenilalanina)-1,4-dioxabicyclo[3.3.0]octano (11c).  $^1\text{H}$  RMN  $\delta$  (DMSO, 400 MHz): 8,16 (br s, 2H, -NH), 7,24-7,15 (m, 10H, -CH), 6,87  
 15 (br s, 2H, -NH), 4,22-4,10 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 4,08-4,00 (m, 2H, -CH), 3,83-3,80 (m, 2H, -CH), 3,64-3,62 (m, 2H, -CH), 2,88-2,72 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 1,29 (s, 18H, -CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  RMN: 172,1 (-C=O), 155,6 (-C=O), 138,2 (-Cq), 129,6 (-CH), 128,5 (-CH), 126,7 (-CH), 86,3 (-CH), 78,6 (-Cq), 71,8 (-CH<sub>2</sub>), 56,3 (-  
 20 CH), 56,0 (-CH), 38,4 (-CH<sub>2</sub>), 28,5 (-CH<sub>3</sub>). ESMS  $m/z$  639 (M + 1). Análise calculada para C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>: C, 63,93; H, 7,26; N, 8,77. Encontrada: C, 63,57; H, 7,33; N, 8,97.  $\alpha_D^{26} = +35,5$  (c, 1,0) DMF. PF = 203-204°C.

(3S, 6S)-bis-N-(N-1-Bis[-*tert*-Butoxicarbonil]-L-histidina)-1,4-dioxabicyclo[3.3.0]octano (11d).  $^1\text{H}$  RMN  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  8,00 (s, 2H, -CH), 7,17 (s, 2H, -CH), 4,41 (s, 2H, -CH), 4,33 (s, 2H, -CH), 3,89-3,85 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3,63-3,60 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3,04-3,00 (m, 2H, -CH), 2,90-2,86 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 1,58 (s, 18H, -CH<sub>3</sub>), 1,40 (s, 18H, -CH<sub>3</sub>).  
 30  $^{13}\text{C}$  RMN: 171,3 (-C=O), 156,0 (-C=O), 146,7 (-C=O), 138,9 (Cq), 136,7 (-CH), 114,7 (-CH), 86,1 (-CH), 85,7 (-Cq), 79,9 (-Cq), 72,5 (-CH<sub>2</sub>), 56,2 (-CH), 54,0 (-CH), 30,7



010401900

(-CH<sub>2</sub>), 28,2 (-CH<sub>3</sub>), 27,8 (-CH<sub>3</sub>). ESMS m/z 817 (M - 1).  
Análise calculada para C<sub>38</sub>H<sub>58</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>: C, 55,73; H, 7,14; N, 13,68. Encontrada: C, 55,53; H, 7,18; N, 13,42.  $\alpha_D^{26} = + 46,8$   
(c, 1,0) CHCl<sub>3</sub>. PF = 115-116°C.

5 (3S, 6S)-bis-N-(N-tert-Butoxicarbonil-L-prolina)-1,4-dioxabicyclo[3.3.0]octano (15e). <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 4,49-4,36 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 4,22 (s, 2H, -CH), 3,92 (s, 2H, -CH), 3,70-3,67 (m, 2H, -CH), 3,40-3,33 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 2,00-1,86 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 1,68-1,60 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 1,45 (s, 18H, -CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN: 171,9 (-C=O), 155,9 (-C=O), 86,2 (-CH), 80,6 (-Cq), 72,3 (-CH<sub>2</sub>), 60,3 (-CH), 56,2 (-CH), 47,1 (-CH<sub>2</sub>), 28,3 (-CH<sub>3</sub>), 22,6 (-CH<sub>2</sub>), 21,0 (-CH<sub>2</sub>). ESMS m/z 539 (M - 1).  
10 Análise calculada para C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>: C, 57,98; H, 7,86; N, 10,40. Encontrada: C, 57,75; H, 8,16; N, 10,31.  $\alpha_D^{26} = -54,7$   
15 (c, 1,0) CHCl<sub>3</sub>. PF 87-88°C.

(3S, 6S)-bis-N-(N-tert-Butoxicarbonil-L-5-metil ácido glutâmico)-1,4-dioxabicyclo[3.3.0]octano (15f). <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  4,53 (br s, 2H, -CH), 4,40 (s, 2H, -CH), 4,15-4,10 (m, 2H, -CH), 3,99-3,97 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3,70 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,53-2,39 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 1,93-1,87 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 1,44 (s, 18H, -CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN:  $\delta$  173,8 (-C=O), 171,7 (-C=O), 156,2 (-C=O), 86,3 (-CH), 80,1 (-Cq), 72,2 (-CH<sub>2</sub>), 56,4 (-CH), 53,5 (-CH), 51,9 (-OCH<sub>3</sub>), 30,2 (-CH<sub>2</sub>), 28,3 (-CH<sub>3</sub>), 27,9 (-CH<sub>2</sub>). ESMS m/z 631 (M + 1). Análise calculada  
20 para C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>: C, 53,32; H, 7,35; N, 8,88. Encontrada: C, 53,02; H, 7,65; N, 8,86.  $\alpha_D^{26} =$  (c, 1,0) CHCl<sub>3</sub>. PF 69-70°C.

(3S,6S)-bis-N-(L-1-tert-Butoxicarbonil ácido piroglutâmico)-1,4-dioxabicyclo[3.3.0]octano (15g). <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (CHCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 7,00 (br s, 2H, -NH), 4,52-4,48 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 4,35-4,31 (m, 2H, -CH), 3,99-3,96 (m, 2H, -CH), 3,76-

30

3,68 (m, 2H, -CH), 2,75-2,64 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 2,49-2,41 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 2,30-2,22 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 2,16-2,08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,49 (s, 18H, -CH<sub>3</sub>). ESMS  $m/z$  565 (M - 1).  $\alpha_D^{29} = -13,3$  (c, 1,0) CHCl<sub>3</sub>. PF 164-165°C.

5

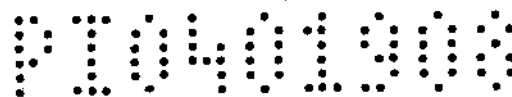
Exemplo 14: Obtenção do (3S, 6S)-bis-N-(L-prolina)-1,4-dioxabicyclo[3.3.0]octano (composto 16).

A uma solução do composto 15e (0,725 mmol, 0,39g) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL) foi adicionado HCl (2,89 mmol, 1,45 mL, solução 2M em éter). A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 4h, quando o precipitado formado foi filtrado e purificado por cromatografia em coluna de sílica gel, obtendo-se o produto 16 (0,204g) em 83% de rendimento. <sup>1</sup>H RMN  $\delta$  (MeOD, 400 MHz): 4,56 (br s, 2H, -NH), 4,35-4,28 (m, 2H, -CH), 4,24-4,18 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 4,03-3,96 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3,82-3,75 (m, 2H, -CH), 3,40-3,32 (m, 2H, -CH), 2,50-2,40 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 2,07-1,95 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C RMN:  $\delta$  168,4 (-C=O), 86,4 (-CH), 71,7 (-CH<sub>2</sub>), 59,72 (-CH), 56,8 (-CH), 46,2 (-CH<sub>2</sub>), 29,9 (-CH<sub>2</sub>), 23,8 (-CH<sub>2</sub>). ESMS  $m/z$  339 (M + 1). Análise calculada para C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: C, 56,79; H, 7,74; N, 16,56. Encontrada: C, 56,48; H, 7,65; N, 16,23.  $\alpha_D^{26} = -1,3$  (c, 0,26) EtOH. PF 185-186°C.

25

Exemplo 15: Obtenção do (3S, 6S)-bis-N,O-(N-tert-Butoxicarbonil-L-prolina-N-tert-Butoxicarbonil-L-fenilalanina)-1,4-dioxabicyclo[3.3.0]octano (composto 17).

A uma solução do composto 4 (0,885 mmol, 0,234g) em DMF anidro (5 mL) foram adicionados EDC (0,171g, 0,885 mmol), HOBT (0,885 mmol, 0,111g), e N-metil morfolina (0,12 mL, 1,10 mmol). Após agitação magnética por 15 min.,



composto 16 (0,44 mmol, 0,151g) em DMF (3mL) foi adicionado e a mistura foi agitada por 12h. O solvente foi evaporado em vácuo e o resíduo foi diluído em CHCl<sub>3</sub>, lavado com solução de HCl 0.1N, água, solução de NaHCO<sub>3</sub> 0.5N e solução saturada de NaCl, seco com sulfato de sódio e concentrado em vácuo. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel fornecendo o produto as um sólido amarelo (0,184g) em 50% de rendimento. <sup>1</sup>H RMN δ (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 7,35-7,15 (m, 10H, -CH), 4,72-4,57 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 4,45-4,44 (m, 2H, -CH), 4,34-4,25 (m, 2H, -CH), 4,00-3,93 (m, 2H, -CH), 3,70-3,67 (m, 2H, -CH), 3,60-3,43 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 3,03-2,86 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 2,25-2,16 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 1,90-1,84 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>), 1,38 (s, 18H, -CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN: δ 174,9 (-C=O), 172,9 (-C=O), 155,2 (C=O), 136,1 (-Cq), 129,3 (-CH), 128,5 (-CH), 126,9 (-CH), 86,2 (-CH), 79,8 (-Cq), 72,5 (-CH<sub>2</sub>), 60,0 (-CH), 56,5 (-CH), 53,5 (-CH), 47,4 (-CH<sub>2</sub>), 39,0 (-CH<sub>2</sub>), 28,3 (-CH<sub>3</sub>), 27,0 (-CH<sub>2</sub>), 25,1 (-CH<sub>2</sub>). ESMS m/z 833 (M + 1). Análise calculada para C<sub>44</sub>H<sub>60</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>: C, 63,44; H, 7,26; N, 10,09. Encontrada: C, 63,10; H, 7,15; N, 9,84. α<sub>D</sub><sup>26</sup> = -24,5 (c, 1,0) CHCl<sub>3</sub>. PF = 68-69°C.

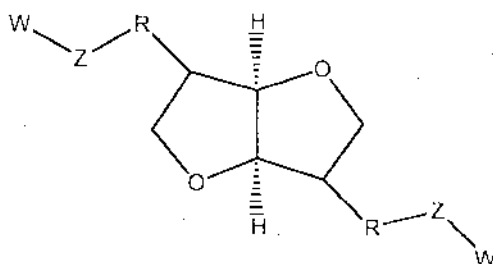
A descrição acima da presente invenção bem como os exemplos foram apresentados com o propósito de ilustração e não limitam a invenção à forma aqui revelada e exemplificada. Em consequência, variações e modificações compatíveis com os ensinamentos acima, e a habilidade ou conhecimento da técnica relevante, estão dentro do escopo da presente invenção. As modalidades acima descritas e exemplificadas têm a intenção de melhor explicar os modos conhecidos para a prática da invenção e para permitir que os técnicos na área utilizem a invenção em tais, ou outras, modalidades e com várias modificações necessárias pelas aplicações específicas ou usos da presente invenção. É a

P10401900

intenção que a presente invenção inclua todas as modificações e variações da mesma, dentro do escopo descrito no relatório e nas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Compostos inibidores de serina protease tendo um eixo de simetria C<sub>2</sub>, caracterizado por possuírem na porção central uma estrutura do tipo 1,4:3,6-dianidromanitol e, nas porções laterais, ligações peptidomiméticas com aminoácidos, de fórmula geral:



(I)

10

R sendo -O- ou -NH com configurações exo e endo, respectivamente; Z sendo os L-aminoácidos alanina, valina, fenilalanina, prolina, lisina, histidina, ácido 5-O-metilglutâmico e ácido piroglutâmico, respectivamente; e W sendo o grupo de proteção di-t-butil-dicarbonato (Boc).

2. Compostos de acordo com o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato dos ditos compostos serem ésteres do isomanide.

3. Compostos de acordo com o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato dos ditos compostos serem amidas do isomanide.

4. Compostos de acordo com o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato dos ditos compostos serem dipeptídeos.

20

5. Processo de obtenção de compostos de acordo com o reivindicado em 2, caracterizado, caracterizado por compreender:

5 a) etapa de proteção dos grupamentos amina dos L-aminoácidos utilizados como reagentes realizada com o reagente Di-*t*-butil-dicarbonato (Boc), formando os compostos aa protegidos;

10 b) etapa de preparação do composto simétrico, 1,4-3,6-dianidro-D-manitol, o isomanide, por desidratação do D-manitol em meio ácido;

15 c) etapa de acoplamento do isomanide com os compostos aa previamente protegidos com formação dos ésteres do isomanide, pelo tratamento do D-manitol com os respectivos compostos aa protegidos e dicloexilcarbodiimida (DCC) em solvente orgânico não polar.

6. Processo de obtenção de compostos de acordo com o reivindicado em 3, caracterizado por compreender:

20 a) etapa de preparação do composto simétrico, 1,4-3,6-dianidro-D-manitol, o isomanide, por desidratação do D-manitol em meio ácido;

b) etapa de conversão do isomanide ao di-tosilado por reação com cloreto de *p*-toluenosulfonila em piridina;

25 c) etapa de tratamento do di-tosilado com azida de sódio em *N,N*-dimetilformamida fornecendo di-azida, com inversão de configuração;

d) etapa de redução da di-azida com paládio sobre carbono em etanol resultando em di-amina, com formação de amidas simétricas derivadas do isomanide;

30 7. Processo de obtenção de compostos de acordo com o reivindicado em 4, caracterizado por compreender:

a) desproteção da amida Pro-Boc usando uma solução de HCl em éter com obtenção de uma amina livre;

b) obtenção do dipeptídeo por acoplamento da amina livre com o fenilalanina Boc-protégida.

5 8. Uso dos compostos de acordo com o reivindicado em 1, caracterizado pelo fato dos ditos compostos serem base na preparação de formulações antivirais para o tratamento de flavivirose.

9. Uso de acordo com o reivindicado em 8, caracterizado pelo fato das ditas flavivirose ser hepatite C.

10 10. Uso de acordo com o reivindicado em 8, caracterizado pelo fato das ditas flavivirose ser febre do oeste do Nilo.

11. Uso de acordo com o reivindicado em 8, caracterizado pelo fato das ditas flavivirose ser dengue.

RESUMO

Patente de Invenção: COMPOSTOS INIBIDORES DE SERINA  
 PROTEASE, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO PARA TRATAMENTO DE  
 FLAVIVIROSES.

5        Refere-se a presente invenção a compostos inibidores  
 de serina protease sintéticos tendo um eixo de simetria  $C_2$ ,  
 possuindo na porção central uma estrutura do tipo 1,4:3,6-  
 dianidromanitol e, nas porções laterais, ligações  
 peptidomiméticas com aminoácidos, como por exemplo, lisina  
 10    (Lis), fenilalanina (Phe), dentre outros, utilizados como  
 base para a preparação de formulações antivirais capazes de  
 cessar a proliferação dos vírus responsáveis pela maioria  
 das flaviviroses, como por exemplo, hepatite C, Dengue e  
 febre do oeste do Nilo.